

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin,
Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie und
Stoffwechsel

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. T. M. Gress
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Rolle von Exosomen-lokalisierten RNAs in der Interaktion zwischen Tumorzellen und Makrophagen im Pankreaskarzinom

Inaugural-Dissertation zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Emelie Maximiliane Landmann
aus Berlin

Marburg, 2019

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität
Marburg am: 11.06.2019

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Herr Prof. Dr. H. Schäfer
Referent:	Herr Prof. Dr. M. Buchholz
1. Korreferent:	Herr Prof. Dr. M. Lauth

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Pankreaskarzinom.....	1
1.1.1	Das Tumorstroma des Pankreaskarzinoms.....	3
1.2	Die Rolle von Makrophagen im Pankreaskarzinom.....	7
1.2.1	Plastizität der Makrophagenpolarisation.....	8
1.3	Extrazelluläre Vesikel.....	10
1.3.1	Exosomen.....	10
1.4	Zielstellung.....	14
2	Materialien und Methoden	15
2.1	Materialien.....	15
2.1.1	Laborgeräte.....	15
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3	Reagenzien und Chemikalien	18
2.1.4	Standards.....	19
2.1.5	Primer, siRNAs, TaqMan Gene Expression Assay, TaqMan Advanced MicroRNA Assays und miRNA Inhibitoren.....	19
2.1.6	Antikörper	22
2.1.7	Reagenzsysteme und Kits.....	23
2.1.8	Nährmedien und zusätzliche Bestandteile.....	24
2.1.9	Säugerzelllinien	26
2.1.10	Puffer und Lösungen.....	27
2.1.11	Computerprogramme	29
2.2	Methoden.....	30
2.2.1	Allgemeine Zellkulturmethoden	30
2.2.2	Methoden im Umgang mit Nukleinsäuren	31
2.2.3	Proteinchemische Methoden.....	36
2.2.4	M1/M2 Polarisation	38
2.2.5	Ko-Kultur Experimente.....	41
2.2.6	Validierung und Isolierung extrazellulärer Vesikel von Tumorzellen und polarisierten Makrophagen	44
2.2.7	Transfektion von S2-007-Zellen mit siRNA IGFII.....	46
2.2.8	Transfektion von polarisierten THP1-Zellen mit miRNA-Inhibitoren	47
2.2.9	Statistische Analyse	48
3	Ergebnisse.....	49
3.1	Etablierung Markersystem für die Polarisation humaner primärer Monozyten zum M1/M2 Typ	49
3.2	Humane THP1- und BlaER1-Zellen lassen sich zum M1/M2 Typ polarisieren.....	51
3.3	Der Einfluss von Makrophagen auf Tumorzellen und von Tumorzellen auf Makrophagen unter Ko-Kulturbedingungen	54
3.4	Der Einfluss von konditioniertem Makrophagen-Medium auf Tumorzellen und von konditioniertem Tumorzell-Medium auf Makrophagen.....	64
3.5	Charakterisierung der Isolation von extrazellulären Vesikeln aus Pankreaskarzinom- Zelllinien und Makrophagen.....	67
3.6	Tumorzell-Exosomen-Behandlung beeinflusst M2-Marker Expression in M2- polarisierten THP1-/BlaER1-Makrophagen.....	71
3.7	Deep sequencing von extrazellulären Vesikeln bezüglich des RNA-Gehalts unter verschiedenen Kulturbedingungen.....	80
3.8	Knock down von IGFII in S2-007-Zellen hat keinen Einfluss auf M2 Polarisation von THP1-Zellen.....	81

3.9	miRNAs 6734, 5787 und 4497 werden sowohl in S2-007-Zellen als auch M2 THP1-Zellen exprimiert und unter Ko-Kulturbedingungen in Vesikel verpackt	84
4	Diskussion	86
4.1	Polarisation von Makrophagen	86
4.2	Der Einfluss von Ko-Kulturen und konditioniertem Medium von Tumorzellen auf die Makrophagenpolarisation und von Makrophagen auf die Tumorzellen	88
4.3	Charakterisierung der Isolation von extrazellulären Vesikeln aus Zellen	92
4.4	Exosomen aus Pankreaskarzinom-Zelllinien beeinflussen die Polarisation von Makrophagen	93
4.5	Der Einfluss von IGFII defizienten Tumorzell-Exosomen auf die Makrophagenpolarisation	98
4.6	Einfluss der Inhibition miRNAs unter Ko-Kulturbedingungen auf die Makrophagenpolarisation	100
4.7	Ausblick/Schlussfolgerung	102
5	Zusammenfassung	103
6	Summary	104
	Literaturverzeichnis	106
7	Anhang	116
7.1	Abkürzungsverzeichnis	116
7.2	Abbildungsverzeichnis	120
7.3	Tabellenverzeichnis	121
	Verzeichnis Akademischer Lehrer	122
	Danksagung	123

1 Einleitung

Die Tumorentwicklung ist ein komplexer Vorgang, bei dem es zu verschiedenen und teilweise aufeinander folgenden genetischen Mutationen in sowohl Onkogenen als auch Tumorsuppressorgenen kommt (Mueller and Fusenig 2004). Hanahan und Weinberg haben beschrieben, dass der fortschreitenden Transformation von gesunden humanen Zellen hin zu hoch malignen Zellen mindesten sechs essenzielle Veränderungen in der Zellphysiologie zugrunde liegen (Hanahan and Weinberg 2000).

- Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren
- Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen
- Umgehung der Apoptose
- unendlich replikatives Potential
- kontinuierliche Angiogenese
- Gewebeinvasion und Metastasierung

Lange hat sich die Krebsforschung auf die Aufklärung der Entstehung genetisch veränderter Tumorzellen konzentriert. In den letzten Jahren wurde jedoch mehr und mehr wahrgenommen, dass die Tumorentwicklung vielmehr aus einer Kombination der Interaktion der Tumorzellen untereinander sowie mit dem den Tumor umgebenden Mikrogewebe (Tumorstroma) resultiert. Das Stroma setzt sich aus extrazellulären Matrixkomponenten sowie aus vielen verschiedenen Zelltypen wie z. B. Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Fibroblasten und Immunzellen zusammen. Trotz der Erkenntnis, dass das Zusammenspiel zwischen Tumor und Stroma einen erheblichen Einfluss auf die Entstehung, Entwicklung und Therapierbarkeit von Tumoren hat und zahlreicher neuer Studien zu dieser Thematik, ist bisher eine vollständige Heilung bzw. Kontrolle stark fortgeschrittener Krebserkrankungen dennoch in vielen Fällen nicht möglich (Albini and Sporn 2007; Mueller and Fusenig 2004; Tlsty and Coussens 2006).

1.1 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreas ist ein Drüsenorgan, das sowohl exokrine als auch endokrine Funktionen ausübt. Der exokrine Anteil ist hierbei der größere und produziert hauptsächlich

Verdauungssekrete, die zur Unterstützung der Nahrungsaufnahme in den Darm abgegeben werden. Der kleinere, endokrine, Anteil des Pankreas ist in Form von Inselzellen (Langerhans-Inseln) in den exokrinen Teil eingebettet. Dieser produziert Hormone wie z. B. Insulin, das zur Regulation des Blutzuckerspiegels ins Blut abgegeben wird (Ulfig 2011). Beide Drüsenanteile des Pankreas können maligne Tumoren entwickeln. Über 95% der Pankreastumore entstehen durch Entartung im exokrinen Drüsenanteil. Eine der häufigsten Tumorarten ist das duktale Adenokarzinom. Jährlich gibt es alleine in Deutschland circa 15000 Neuerkrankungen. Aufgrund der überaus schlechten Prognosen für diese Erkrankung versterben jährlich nahezu gleich viele Erkrankte wie Neuerkrankungen auftreten. Damit rangiert das duktale Adenokarzinom an vierter Stelle auf der Liste für krebsbedingte Todesfälle. Ursache für die äußerst ungünstige relative 5-Jahres-Überlebensrate von 8-9% ist vorrangig eine sehr späte Diagnosestellung, da in frühen Stadien dieser Krankheit keine oder lediglich unspezifische Symptome auftreten (Robert-Koch-Institut and Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2015; Seufferlein et al. 2013). Die späte Diagnosestellung mit Hilfe von Biopsien, Oberbauchsonographie oder Computertomographie/Magnetresonanztomographie bedingt auch ein geringes Ansprechen auf die gängigen Therapieoptionen wie die chirurgische Resektion, Gabe von Chemotherapeutika (Gemcitabin, 5-Fluorouracil) allein oder in Kombination mit Nab-Paclitaxel, Leucovorin, Irinotecan oder Oxaliplatin (El Kamar, Grossbard, and Kozuch 2003; Robinson 2002; Seufferlein et al. 2013; Vincent et al. 2011). Zusätzlich erschwert wird die Therapierbarkeit in späten Diagnosestadien durch die einsetzende Metastasierung aufgrund des aggressiven Verlaufs. Das Pankreaskarzinom ist demzufolge nach wie vor, trotz intensiver Forschung, mit der niedrigsten Überlebensrate von allen Krebsarten gekennzeichnet (Robert-Koch-Institut and Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2015; Seufferlein et al. 2013). Als Risikofaktoren, einen Pankreastumor zu entwickeln, gelten starker Tabakkonsum oder Diabetes (länger als 20 Jahre), Sie erhöhen die Wahrscheinlichkeit auf eine Erkrankung um das 2 – 3,7-fache. Um den Faktor 50-57 steigt das Risiko einer Erkrankung, wenn in der Familie bereits drei Fälle von Pankreaskarzinom-Erkrankungen, bei Verwandten ersten Grades bekannt sind oder wenn man erblich bedingt an einer chronischen Pankreatitis leidet (Klapman & Malafa, 2008; Robert-Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2015).

Für die Entstehung des duktales Adenokarzinomes im Pankreas ist ein Progressionsmodell mit verschiedenen Stufen an Tumorstufen-Läsionen beschrieben worden (Cubilla and Fitzgerald 1976; Hruban et al. 2004). Die sogenannten *pancreatic intraepithelial neoplasias* (PanINs) entwickeln sich über die Stufen PanIN 1A, 1B bis hin zu 2 und 3. Mit Zunahme der Läsionen treten gehäuft genetische und molekulare Veränderungen auf. Meist sind zu Beginn dieses Prozesses Onkogene als auch Tumorsuppressorgene von genetischen Veränderungen betroffen. So treten aktivierende Mutationen im Onkogen *kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (KRAS) bereits in sehr frühen Phasen der PanIN-Entstehung auf. Zudem zeigen sich auch hohe Mutations- bzw. Deletionsraten in den Tumorsuppressorgenen p53, *inhibitors of CDK4* (INK4a), *cyclin dependent kinase inhibitor 2A* (CDKN2A/p16), und *deleted in pancreatic carcinomas locus 4/small body size mothers against decapentaplegic* (DPC4/SMAD4) (Cubilla and Fitzgerald 1976; Hahn et al. 1996; Hruban et al. 2000, 2004; Nobukawa 2003; Ormanns et al. 2014).

1.1.1 Das Tumorstroma des Pankreaskarzinoms

Charakteristisch für das Pankreaskarzinom ist das Vorhandensein eines sehr stark ausgeprägten Tumorstromas, das bis zu 80% der gesamten Tumormasse ausmachen kann (Erkan et al. 2012). Schon in frühen PanIN-Läsionen oder bei inflammatorischen Zuständen im Gewebe sind erste stromale Veränderungen erkennbar. Daher gilt eine chronische Pankreatitis auch als hoher Risikofaktor für die Entstehung eines Tumors (Detlefsen et al. 2005; Malka et al. 2002; Whitcomb 2004). Die Entstehung des Tumorstromas hängt von der Interaktion zwischen Tumorzellen, nicht malignen Zellen und Zellen der extrazellulären Matrix im betreffenden Gewebe ab. Das Stroma des Pankreaskarzinoms setzt sich im Wesentlichen aus mesenchymalen Zellen (Fibroblasten), vaskulären Zellen und Immunzellen zusammen (Chu et al. 2007).

Welche Rolle das Tumorstroma des Pankreas beim Krankheitsverlauf genau spielt, ist nach wie vor Gegenstand intensiver Forschung; dass das Stroma vielfältig Einfluss u.a. auf die Therapierbarkeit der Tumore nimmt, gilt jedoch mittlerweile als gesichert.

Eine zentrale Rolle bei der Interaktion zwischen Tumorzellen und dem umgebenden Stroma spielt das Hedgehog Signalsystem (Olive et al. 2009). Hedgehog-Liganden werden von Pankreas Epithelzellen exprimiert, die bereits einem inflammatorischen Einfluss unterliegen, z. B. wie bei einer Pankreatitis oder in sehr frühen Stadien der

Pankreaskarzinomentwicklung (Thayer et al. 2003). So zeigten *in vitro* und Zelltransplantationsexperimente, dass Hedgehog-exprimierende Tumorzellen zu einer Aktivierung von Sternzellen und Fibroblasten führten. Dies hatte eine fördernde Auswirkung auf die Tumorzellproliferation, Invasion und Chemoresistenz und negative Effekte auf die Überlebensrate (Bailey et al. 2008; Hwang et al. 2008). Folglich wurden Kombinations-Therapien mit Hedgehog-Inhibitoren in klinischen Studien getestet. Dabei ergaben sich sogar schlechtere Überlebensraten der Patienten gegenüber einer alleinigen Gemcitabin-Behandlung, sodass die klinischen Studien abgebrochen wurden (Kim et al. 2014).

Ein weiterer Ansatz waren Lysyl-Oxidase (LOX)-Inhibitoren. Die Lysyl Oxidase steuert die Kollagenreifung und ist im Tumorstroma überexprimiert. In *Kras^{LSL.G12D}/+; p53^{R172H}/+; Pdx^{Cretg}/+* (KPC) Mausmodellen führte eine Therapie mit Gemcitabin und LOX-Inhibitoren zu einer Verlängerung der Überlebensdauer und verringerte die Metastasierung. Der Einsatz von fokalen Adhesionskinase-Inhibitoren in Mäusen führte zu einer Reduktion der Kollagenbildung in der extrazellulären Matrix und so zu einer Verringerung von immunsuppressiven Zellen im Tumor, einer verbesserten Überlebensrate und sensitiverem Ansprechen auf Immuntherapeutika (Jiang et al. 2016). Obwohl das Konzept den Tumor durch die Eliminierung von einzelnen Stromakomponenten oder sogar des gesamten Stromas für die Wirkung von Medikamenten und Chemotherapien angreifbarer zu machen vielversprechend erscheint, waren zahlreiche klinische Studien nicht erfolgreich. (Catenacci et al. 2015). Erfolgsversprechender scheint der Ansatz hin zu einer personalisierten Antistromatherapie mit beispielsweise *pegvorhyaluronidase alfa* (PEGPH20) und Gemcitabin, das bei Patienten mit hohem Hyaluron Anteil diesen eliminiert und das Ansprechen auf die Gemcitabintherapie verbessert (Hingorani et al. 2018).

Wie die beiden oben genannten Beispiele zeigen, spielen im Stroma ansässige tumorassoziierte Fibroblasten verschiedene Rollen (cancer-associated fibroblasts; CAFs) während der Tumorentwicklung und Progression (Öhlund et al. 2017; Öhlund, Elyada, and Tuveson 2014). So wurde belegt, dass CAFs keineswegs nur von aktivierten Sternzellen (pancreatic stellate cell; PSC) abstammen, die den Hauptanteil des stromalen Kollagens produzieren und für desmoplastische Reaktionen verantwortlich gemacht werden. CAFs entwickeln sich auch aus *mesenchymal stem cells* (MSCs), welche ebenfalls tumorfördernde Eigenschaften aufweisen, unter anderem durch ihre Fähigkeit die Polarisation tumorfördernder Makrophagen zu induzieren

(Mathew et al. 2016). CAF stammen aber auch von ortsansässigen Fibroblasten, Endothelzellen oder Fibrozyten ab (Garcia et al. 2012; Öhlund, Elyada, and Tuveson 2014). Diese Abstammungsvielfalt von CAFs führt zu einer hohen Diversität an möglichen Funktionen innerhalb der Tumorentwicklung. Hinzu kommt, dass CAFs eine hohe Plastizität aufweisen und je nach ihrem juxtakrinen und/oder parakrinen Umfeld in verschiedene Subtypen mit neuen Eigenschaften transdifferenzieren können (Kalluri 2016). So konnte in einem Ko-Kultur-System mit Tumorzellen und inaktiven PSCs gezeigt werden, dass PSCs zu myofibrotischen oder inflammatorischen CAFs transdifferenzieren können (Öhlund et al. 2017). Andererseits konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten und auch deren extrazelluläre Matrix die Proliferation von verschiedenen Tumorzelllinien einschränkt oder sogar inhibiert (Bolm et al. 2017; Flaberg et al. 2011). Einige Stomakomponenten verlangsamen somit die Entwicklung des Tumors, während andere sie begünstigen. Vor diesem Hintergrund ist es ratsam, Therapie-Strategien zu entwickeln, die die positiven Eigenschaften von normalen Fibroblasten schützen und nur die entarteten CAFs angreifen, um ein besseres Therapieansprechen zu erzielen. Unter anderem ließ sich belegen, dass CAFs über extrazelluläre Vesikel mit Tumorzellen kommunizieren. Unter Gemcitabin Behandlung führt dies zu einer erhöhten Produktion von Exosomen in CAFs, was den Snail-Signalweg in den Tumorzellen aktiviert und gleichzeitig die Zellproliferation und Therapieresistenz begünstigt (Richards et al. 2017). Ein weiterer Ansatz ist die Blockade des *hepatocyte growth factor/tyrosine-protein kinase Met* (HGF/c-MET) Weges zwischen PSCs und Tumorzellen. In präklinischen Studien zeigte sich hier eine Verbesserung der Therapieeffizienz (Pothula et al. 2016, 2017).

Eine wichtige Rolle im Tumorstroma spielen darüber hinaus die Zellen des Immunsystems. Dazu zählen Lymphozyten, Myeloidzellen und Monozyten. Die Einwanderung von cytotoxischen CD8⁺ T-Zellen wird mit einer besseren Prognose für Patienten mit Pankreaskarzinom assoziiert (Fukunaga et al. 2004). Von der Anzahl an CD8⁺ T-Zellen im Tumor lässt sich jedoch nicht auf die antitumorale Wirkung schließen. Einmal eingewanderte CD8⁺ T-Zellen können in einen funktionsgestörten Zustand transformieren, was zu einem Verlust der zytotoxischen Eigenschaften führt (Bauer et al. 2014). In Patienten mit Pankreaskarzinom wurde nachgewiesen, dass T-Zellen im Tumor verstärkt *programmed cell death 1 ligand 1* (PD-L1) exprimieren, was eine gestörte Antitumor-Reaktion zu Folge hat (Shibuya et al. 2014). Obwohl nachgewiesen wurde, dass CD8⁺ T-Zellen in das Tumorgewebe einwandern und

entartete Zellen erkennen können, kommt es dennoch nur zu einer stark abgeschwächten T-Zell-Reaktion. Dies wird durch die Anwesenheit von z. B. regulatorischen T-Zellen, *myeloid-derived suppressor cells* (MDSCs), tumorassoziierten Makrophagen (TAMs) und inhibitorischen Zytokinen wie *transforming growth factor β* (TGF- β), Interleukin (IL)-10 und *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) unterstützt (Bailey et al. 2016). Trotz der Akkumulation lymphatischer Zellen im Tumorgewebe bei der Mehrheit von Pankreaskarzinom-Patienten gibt es eine Vielzahl an Möglichkeiten, wie sich der Tumor einer adäquaten Immunantwort entziehen kann. So wurde gezeigt, dass in den Tumor eingewanderte $\delta\gamma$ T-Zellen vermehrt T-Zell-*exhaustion*-Liganden wie PD-L1 und Galectin 9 exprimieren, was einerseits zu einer niedrigen Zytotoxizität und andererseits zu einer geringen Aktivierung von T-Zellen führt, obwohl genügend CD8⁺ T-Zellen im Tumormilieu vorhanden sind (Bailey et al. 2016; Daley et al. 2016).

Um dem Auftreten von T-Zell-*exhaustion* therapeutisch entgegenzuwirken, wurden sogenannte Checkpoint-Inhibitoren gegen PD-L1, *cytotoxic T lymphocyte antigen 4* (CTLA-4) und *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3* (TIM-3) entwickelt. Diese Ansätze zeigten jedoch bei dem überwiegenden Anteil von Pankreaskarzinom-Patienten in klinischen Studien keinen Effekt bei der Behandlung (Bauer et al. 2016; Freeman et al. 2000; Neesse et al. 2018). Auch hier besteht daher weiterhin Forschungsbedarf in Richtung personalisierter Therapien. Bereits belegt ist, dass Fehler im *deoxyribonucleic acid* (DNA)-Mismatch-Reparatur-System (MMR) in Tumoren die Mutationsrate erhöhen und so zur gesteigerten Expression von neuartigen Antigenen führen. So konnte gezeigt werden, dass MMR defiziente Tumore durch vermehrt eingewanderte Immunzellen in den Tumor und ein erhöhtes Level an Th1 Zytokinen, eine verstärkte Stimulation des Immunsystems aufwiesen (Dolcetti et al. 1999). Le et al., zeigten, dass die Anwendung des Checkpoint-Inhibitors Pembrolizumab bei Patienten mit MMR defizienten Tumoren die Überlebensrate deutlich erhöhte (Le et al. 2015). Um die Anwendung von Checkpoint-Inhibitoren auf weitere Patientengruppen auszudehnen, müssen weitere Biomarker bzw. Subgruppen von Pankreastumoren identifiziert werden. Weiterhin wird versucht die Anwendung von Checkpoint-Inhibitoren auszudehnen, indem diese mit T-Zell stimulierenden Therapien kombiniert werden. Dazu gehören der adaptive Zell-Transfer, Vakzinierung oder die metabolische Veränderung mittels kleiner Moleküle wie Inhibitor Indoximod (IDO) (Guo et al. 2017).

Tumorinfiltrierende Zellen aus dem Stroma wie TAMs, tumorassoziierte Neutrophile (TANs), Monozyten und MDSCs sind bekannt für ihre tumorunterstützende Wirkung bei der Anwendung einer adäquaten Immunreaktion gegen den Tumor. Da Makrophagen Hauptgegenstand der Arbeit sind, wird im folgenden Kapitel genauer auf diese Zellart eingegangen (Neesse et al. 2018; Skelton et al. 2017).

1.2 Die Rolle von Makrophagen im Pankreaskarzinom

Die Rolle von tumorassoziierten Makrophagen im Tumormilieu ist vielseitig diskutiert. So wirken TAMs in kolorektalen, Magen oder Haut-Tumoren eher proinflammatorisch und antitumoral, was mit einer guten Prognose für Patienten verbunden ist (Ong et al. 2012). Dagegen steht jedoch, dass TAMs in der Mehrzahl der soliden Tumoren eine tumorunterstützende Wirkung zu haben scheinen. Zahlreiche klinische Studien belegen eine Korrelation zwischen einem hohen Makrophagen-Anteil im Tumor und einer schlechten Prognose für Patienten mit Brust-, Prostata-, Eierstock- oder Gebärmutterhalskrebs. Daher wird vermehrtes Aufkommen von TAMs im Tumormilieu oft mit einer wesentlich aggressiveren Tumorentwicklung und einem erhöhten Metastasierungspotential assoziiert (Pollard 2004; Sica et al. 2006). Die Freisetzung verschiedenster Zytokine, Proteasen und Wachstumsfaktoren wie z. B. der *vascular endothelial growth factor* (VEGF), führt zu einer verstärkten Angiogenese und förderlichen Tumorentwicklung (Skelton et al. 2017). Dazu kommt, dass TAMs in der Lage sind, die Effizienz der Chemotherapie zu schwächen. In Pankreaskarzinomen scheinen TAMs beispielsweise die Aktivität von *cytidine deaminase* (Cda) zu beeinflussen. Cda trägt zur Deaktivierung von Gemcitabin bei. Eine erhöhte Aktivität führt dementsprechend zu einer Resistenz gegen Gemcitabin. Des Weiteren schwächen TAMs die Wirkung von Bestrahlung und gezielter Antiangiogenese-Behandlung (Brown, Recht, and Stober 2017). Um diese pro-tumorigen wirkenden Mechanismen zu inhibieren, wurden Antikörper gegen *colony stimulating factor 1 receptor* (CSF1R) oder gegen kleine Moleküle, wie das Chemokin CCR2 entwickelt und getestet (Nywenning et al. 2017; Ries et al. 2014; Zhu et al. 2014). Das Chemotherapeutikum Zoledronate induziert in phagozytischen Myeloidzellen Apoptose. Diese Therapieansätze zeigten in präklinischen Modellen ein hohes Potential und werden derzeit bei verschiedenen soliden Krebsarten, inklusive beim Pankreaskarzinom, getestet (Griesmann, 2016). Auch die Kombination von CSF1R-Inhibitoren mit CXCR2-Antagonisten oder mit

Checkpoint-Inhibitoren zeigten eine deutlich effizientere Therapieantwort im Vergleich zur Einzeltherapieanwendung (Kumar et al. 2017; Neesse et al. 2018).

1.2.1 Plastizität der Makrophagenpolarisation

Tumorassoziierte Makrophagen stammen von monozytären Vorläuferzellen ab. Sie werden hauptsächlich durch Tumorzell-sezernierte Chemokine wie CCL2, welcher wiederum durch Zytokine wie *tumor necrosis factor alpha* (TNF α), Interferon-gamma (IFN γ) und IL1 β induziert wird, aber auch Wachstumsfaktoren, wie z. B. VEGF oder *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) aus dem Blut in den Tumor rekrutiert (Barleon et al. 1996; Dorsch et al. 1993; Graves et al. 1989; Jöhrer et al. 2008; Pollard 2004). Im Gewebe differenzieren Monozyten unter dem Einfluss verschiedenster Faktoren zu Makrophagen. Diese weisen je nach vorherrschenden Stimulanzen im Tumormilieu deutlich unterscheidbare funktionelle Phänotypen auf. In der aktuellen Literatur werden diese beiden Phänotypen, ähnlich wie die Polarisierung von T-Helferzellen zu Th1 und Th2, in M1 und M2 Makrophagen unterschieden (Sica and Mantovani 2012).

M1 Makrophagen, auch als klassisch aktivierte Makrophagen bezeichnet, werden durch mikrobielle Erzeugnisse wie Lipopolysaccharide (LPS) oder proinflammatorische Zytokine wie IFN γ oder TNF α induziert. Charakteristisch für M1 Makrophagen ist die ausgeprägte Fähigkeit zur Antigenpräsentation, eine hohe Interleukin-12 und Interleukin-23 Produktion sowie die Herstellung von toxischen Zwischenprodukten - reaktive Stickstoff - und Sauerstoffverbindungen. Des Weiteren sind M1 Makrophagen fähig, eine Th1-Immunantwort zu induzieren. Daher werden M1 Makrophagen mit der Eigenschaft in Verbindung gebracht nicht nur pathogene Mikroorganismen, sondern auch Tumorzellen zu vernichten (Mantovani et al. 2004; Niedobitek et al. 2015; A. Sica and Mantovani 2012).

Die alternativ aktivierten Makrophagen, oder auch M2 Makrophagen genannt, wirken eher anti-inflammatorisch. Je nach vorhandenem Stimulus entwickeln sich verschiedene voneinander unterscheidbare Subtypen mit jeweils unterschiedlichen Funktionen. M2a Makrophagen werden durch IL-4 und IL-13 stimuliert. Sie gelten als profibrotisch, können Parasiten abtöten, eine Th2 Antwort induzieren und eine Typ II Inflammation unterstützen. Charakteristisch ist eine erhöhte Expression des Mannose-Rezeptors (CD206) und *chitinase-like YM-1* (Mantovani et al. 2013; Mantovani, Sica, and Locati

2005; Weagel et al. 2015). M2b Makrophagen werden durch IC bzw. *toll-like receptor* (TLR)/IL-1 Rezeptorliganden aktiviert. Im Unterschied zu den anderen Subtypen induzieren sie eher eine Th1 Antwort und wirken immunregulatorisch, sodass sie das Tumorwachstum und die Metastasierung unterdrücken. M2c Makrophagen werden durch IL-10 oder TGF- β stimuliert. Sie unterdrücken eine Immunantwort und übernehmen Funktionen bei der Gewebeneubildung oder Matrixumbildung (Mantovani et al. 2004, 2013; Weagel et al. 2015). So ist für diese M2 Makrophagen eine hohe Arginase Expression charakteristisch. Arginase katalysiert die Produktion von Ornithin. Aus Ornithin entstehen die Endprodukte Prolin, das für die Kollagensynthese wichtig ist, und Polyamine, die wiederum in der Zellproliferation und der Geweberegeneration eine Rolle spielen (Niedobitek et al. 2015).

Makrophagen können auch in den sogenannten M2 like Status polarisiert werden. Ausgelöst wird dies durch Stimuli wie LPS, IL-1, Glukokortikoide, TGF- β , *wingless Int 5* (Wnt5), IL-10, CCL2 oder CXCL4. Diese Art von Makrophagen teilen einige Eigenschaften mit den M2a Makrophagen, wie z. B. die erhöhte Expression des Mannose-Rezeptors (Mantovani et al. 2013).

Tumor assoziierte Makrophagen, auch als M2d Makrophagen bezeichnet, zeigen Eigenschaften, die die Entwicklung von Tumoren unterstützen, die Angiogenese beschleunigen und das Zellwachstum von malignen Zellen fördern. Da M2d Makrophagen in nahezu allen soliden Tumoren verstärkt vorkommen, werden sie in Verbindung mit einem geringen Therapieerfolg und einer niedrigen Überlebensrate von Patienten gebracht. M1 Makrophagen dagegen können Tumorzellen erkennen und eliminieren, daher ist ihre Anwesenheit im Tumormilieu mit einer guten Prognose verbunden (Weagel et al. 2015). Diese Annahme wird von verschiedenen Studien unterstützt (Bronkhorst et al. 2011; Ma et al. 2010).

Des Weiteren ist zu beachten, dass bei *in vitro* Experimenten durch die Gabe bestimmter Stimuli die Phänotypen von Makrophagen gezielt in eine bestimmte Richtung polarisiert werden können. *In vivo* hingegen sind Makrophagen einer Vielzahl gleichzeitig auf sie einwirkender Signale ausgesetzt. Dies führt dazu, dass eher gemischte Makrophagen-Phänotypen auftreten, die nicht mehr klar der M1 oder M2 Richtung zugeordnet werden können (Ong et al. 2012; Shaul et al. 2010; Torroella-Kouri et al. 2009).

1.3 Extrazelluläre Vesikel

Früher wurde davon ausgegangen, dass Zellen in komplexen Organismen untereinander entweder über direkten Zell-Zell-Kontakt oder durch extrazelluläre Moleküle (Neurotransmitter, Hormone, Lipide, Nukleotide, Peptide oder Proteine) über Rezeptorbindungen kommunizieren können (Raposo and Stoorvogel 2013). Inzwischen gilt jedoch als gesichert, dass nahezu alle Zellen extrazelluläre Vesikel (EVs) sezernieren. Über extrazelluläre Vesikel sind Zellen in der Lage Proteine, Lipide, RNAs oder einzel- und doppel-strängige DNA auszutauschen. Aufgenommene extrazelluläre Vesikel können biologische Funktionen von Signalaktivierungen der Empfängerzelle beeinflussen. Dies sind z. B. Mechanismen der Immunmodulation, Stammzelldifferenzierung, Geweberegeneration, Angiogenese, Autophagie, Tumor-Invasion und -Metastasierung. Obwohl in der Literatur verschiedene Terminologien bezüglich der Definition und Identifikation von EVs kursieren, werden nur zwei Arten unterschieden. Dazu zählen abgeschnürte Mikrovesikel und Exosomen. Mikrovesikel sind 100 bis 1500 nm groß und entstehen durch direkte Knospung an der zellulären Plasmamembran. Exosomen sind 30 bis 150 nm groß und stammen aus *multivesicular bodies* (MVBs), welche durch Verschmelzung mit der Plasmamembran die Exosomen in den extrazellulären Raum freigeben. (Greening and Simpson 2018)

1.3.1 Exosomen

Exosomen kommen in physiologischen Flüssigkeiten wie bronchialveolärer Lavage-Flüssigkeit, humanem Plasma, Urin, malignem Ascites oder Muttermilch vor (Admyre et al. 2007). Diese Vesikel werden sowohl von hematopoetischen als auch nicht-hematopoetischen Zelltypen wie Retikulozyten, B-/T-Lymphozyten, Blutplättchen, dendritische Zellen (DCs), Makrophagen, Epithelzellen und auch Tumorzellen gebildet (Admyre et al. 2007; D. Kumar et al. 2014).

Die Ausbildung von *multivesicular bodies* (MVBs) beginnt mit der Formierung eines Endosoms durch die Einstülpung der zellulären Plasmamembran. Im Verlauf dieses Prozesses kommt es zu weiteren Membraneinstülpungen, den späten Endosomen, was zu einem kontinuierlichen Anstieg von intraluminalen Vesikeln führt. Zu diesem Zeitpunkt hat sich das Endosom zu einem MVB formiert, welches mehrere Vesikel, gefüllt mit zytosolischen Anteilen, Proteinen und Nukleinsäuren, enthält. Nicht alle MVBs fusionieren mit der Plasmamembran, um die Vesikel in Form von Exosomen in

den extrazellulären Raum zu entlassen. MVBs fusionieren auch mit dem Lysosom, wo der Inhalt der Vesikel degradiert wird, und zwar abhängig vom Ceramid-Gehalt in der MVB-Membran (erhöhte Ceramidkonzentrationen führen zu einer Fusion mit der Plasmamembran) (Brinton et al. 2015; Cocucci and Meldolesi 2015; Katzmann et al. 2003). Die Entscheidung, ob Proteine in den MVB sortiert oder verpackt werden sollen wird auf Basis von cis-wirksamen Sortierungssignalen wie Ubiquitin und trans-wirksamen Faktoren wie dem *endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT) Mechanismus gesteuert (Katzmann et al. 2003).

Der exakte Mechanismus zur Exosomen Verpackung ist derzeit allerdings noch Gegenstand intensiver Forschung. Es ist zurzeit lediglich bekannt, dass diese mit dem MVB-Mechanismus zusammenhängen, da ESCRT Proteine in der Membran von Exosomen vorhanden sind (Colombo et al. 2013; Piper and Katzmann 2007; Yeo 2003). Die Lipid- und Protein-Zusammensetzung von Exosomen wurde bereits mittels verschiedenster Techniken wie Western Blot, Fluoreszenzaktivierter Zellsortierung, Immuno-Elektronenmikroskopie oder Massenspektrometrie analysiert (Théry et al. 2001).

Das molekulare Profil von Exosomen spiegelt teilweise das der Ursprungszelle wider. Es gibt aber auch Komponenten, die allen Exosomen gemein sind. So sind die Membranen von Exosomen angereichert mit Endosom-ähnlichen Membran-, Transport- und Fusionsproteinen wie Annexin, Flotillin oder *guanosine triphosphate hydrolase* (GTPasen). Die Lipide der Doppellipidmembran setzen sich aus Ceramiden, Sphingomyelinen und Cholesterol zusammen. Auf der Oberfläche von Exosomen sind verschiedene Endosomen-spezifische Membranproteine wie, z. B. CD9, CD63, CD81, CD82, aber auch ESCRT assoziierte Proteine, wie *apoptosis-linked gene-2 interacting protein X* (ALIX) sowie *tumor susceptibility gene 101* (TSG101), verankert. Verschiedene Adhäsionsmoleküle, wie intermolekulares Adhäsionsmolekül-1, CD146 und CD18 wurden in Exosomen identifiziert. Auch die *heat shock proteins* (HSP) 70 und HSP 90 gehören zu den gemeinsamen Komponenten der Exosomen. Dagegen wurden in isolierten Exosomen aus antigenpräsentierenden Zellen spezifisch nur *major histocompatibility complex* (MHC)II und CD86 detektiert. Ebenso kommt *milk fat globule-EGF factor 8 protein* (MFG-E8)/Lactadherin nur in Exosomen von unreifen dendritischen Zellen vor (Andreu and Yáñez-Mó 2014; Colombo et al. 2013; Gastpar et al. 2005; Mears et al. 2004; Segura, Amigorena, and Théry 2005; Théry et al. 2001; Véron et al. 2005).

Die Funktion von Exosomen hängt einerseits von der Art der Zellen ab, von denen sie sezerniert werden, aber auch von der spezifischen Zusammensetzung an Lipiden, Kohlenhydraten und Proteinen. Auf Grund ihrer hohen Diversität an Rezeptoren auf der Vesikeloberfläche können sie eine Vielzahl an Ziel-Zellen ansteuern und durch Austausch des enthaltenen Materials zur Zell-Zell-Kommunikation beitragen (Schorey and Bhatnagar 2008).

Neben vielfältigen Funktionen, wie beispielsweise der Ausschleusung von löslichen Rezeptoren oder der Eigenschaft durch Antigenpräsentation gezielt T-Zellen zu einer antitumorreaktion zu sensibilisieren, können Exosomen durchaus auch immunsupprimierend wirken. So trugen Exosomen aus T-Zellen, Melanoma-Zellen und Ovarialtumor-Zellen den FasL-Liganden, welcher ein T-Zell Absterben induzieren kann (Andreola et al. 2002; Martínez-Lorenzo et al. 1999). Exosomen fungieren aber auch als *shuttle* für RNAs. Valadi *et al.* konnten nachweisen, dass Exosomen mit mRNA und microRNA angereichert sind. So sind Exosomen aus humanen oder murinen Mastzellen in der Lage, RNA-Moleküle auf benachbarte Mastzellen zu übertragen. Da die übertragenen RNAs auch translatiert wurden, spricht dies für eine biologische Aktivität der RNAs. Daher können Exosomen, durch den Transfer von RNAs, ihrer Zielzelle neue Funktionen und Eigenschaften verleihen (Valadi et al. 2007).

Tumorzellen produzieren Millionen von Exosomen, die dazu beitragen können, ihr Stroma in ein Tumor-unterstützendes Mikromilieu umzuwandeln. Das durch Exosomen aufgebaute Kommunikationsnetzwerk kann dabei einerseits die Tumorentwicklung und Metastasierung fördern, aber auch zur Abschwächung der Anti-Tumor-Immunantwort, Veränderung der Stromazellreaktion, Unterstützung des Wachstums von neuen Blutgefäßen und dem allgemeinen Wachstum der Tumorzellen selbst beitragen.

Die Fähigkeit der Exosomen aus murinen Melanoma-Zellen das Knochenmarksgewebe hin zu einem Melanoma-unterstützendem Milieu umzuwandeln wurde von Peinado *et al.* gezeigt. Auch die Fähigkeit von Exosomen verschiedenste mRNAs und microRNAs auf Zielzellen zu übertragen, die dann in funktionelle Proteine umgeschrieben werden können oder die Genexpression regulieren, unterstützt dies zusätzlich (Peinado et al. 2012; Whiteside 2016).

MicroRNAs, abgekürzt miRNAs, beschreiben eine Art von kleinen nicht-proteinkodierenden RNAs mit einer Größe von 21 bis 23 Nukleotiden. Sie kommen in verschiedenen Organismen vor und sind entscheidend an der Regulation der Genexpression beteiligt (Lagos-Quintana et al. 2001). Sie sind aber auch in andere

biologische Prozesse involviert, wie z. B. der Stressresistenz, Zelldifferenzierung oder dem Zelltod. Außerdem können sie als Onkogen oder Tumorsuppressor agieren und so die Tumorentwicklung und die Metastasenbildung beeinflussen (Hu, Drescher, and Chen 2012; Ogawa et al. 2008; Taylor and Gercel-Taylor 2008). Von Tumoren freigesetzte Exosomen beinhalten verschiedenste RNA Populationen, unter anderem miRNAs. Es wird vermutet, dass exosomale miRNAs die miRNA Zusammensetzung des Tumors widerspiegeln und dadurch gezielt tumorspezifische Moleküle auf andere Zielzellen übertragen können. Außerdem wurde gezeigt, dass exosomale miRNAs positiv mit dem Stadium der Tumorprogression korrelieren (Al-Nedawi et al. 2008; Mitchell et al. 2008; Taylor and Gercel-Taylor 2008; Vizio et al. 2009). Fabbri *et al.* berichteten, dass Tumorzell-sezernierte miRNAs an TLRs binden, um so eine pro-metastatische Entzündungsreaktion zu induzieren. Sie zeigten, dass exosomale miR-21 und miR-29a an TLR8 und TLR7 von Immunzellen binden und so eine TLR bedingte NF- κ B Aktivierung und die Freisetzung pro-metastatischer inflammatorischer Zytokine bewirken (Fabbri et al. 2012). Dadurch fungieren exosomale miRNAs als parakrine Agonisten der TLRs und gelten als Schlüsselregulatoren der Tumormikroumgebung (Bach et al. 2017). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass miR-6126 in Exosomen von verschiedenen Eierstockkrebszellen konsequent überexprimiert war und weiterführend als Regulator für Integrin β -1 galt. Ying *et al.* dagegen entdeckten, dass miR-222-3p Transkripte im Vergleich zu ihren Herkunftszellen signifikant vermehrt in Exosomen vorkamen. Darüber hinaus kann miR-222-3p via Exosomen von Eierstockkrebszellen auf Makrophagen übertragen werden (Kanlikilicer et al. 2016; Ying et al. 2016). Insgesamt kann gesagt werden, dass exosomale miRNAs eine entscheidende Rolle bei der Tumorgenese, dem Wachstum, der Metastasierung und der Kommunikation mit der Tumormikroumgebung einnehmen. (Bach et al. 2017)

1.4 Zielstellung

miRNAs und andere nicht-kodierende RNA-Spezies spielen wichtige regulatorische Rollen in der Entstehung und Progression maligner Tumoren, darunter auch in der funktionellen Interaktion von Tumorzellen mit Zellen des umgebenden entzündlichen Stromas. Hier ist vor allem die Rolle der Makrophagen interessant.

In Pankreaskarzinomen wie auch in anderen Malignomen finden sich hauptsächlich sogenannte M2 Makrophagen, denen tumorprogressionsfördernde Eigenschaften zugeschrieben werden (Kurahara et al. 2011). In dieser Arbeit soll die Rolle von nicht-kodierenden RNAs bei der Polarisation von tumorassoziierten Makrophagen in exokrinen Pankreastumoren funktionell untersucht werden. Dabei sollen folgende Fragestellungen beantwortet werden.

1. Lassen sich Makrophagen gezielt in funktionelle M1/M2 Typen polarisieren?
2. Welchen Einfluss üben Tumorzellen auf Makrophagen bzw. Makrophagen auf Tumorzellen unter Ko-Kulturbedingungen aus?
3. Beeinflussen Tumorzell-sezernierte Exosomen den Polarisationsstatus von tumorassoziierten Makrophagen?
4. Welche funktionell aktiven miRNAs oder andere nicht-kodierende RNAs werden speziell in Tumorzell-sezernierte extrazelluläre Vesikel verpackt und beeinflussen spezifisch die Differenzierung von tumorassoziierten Makrophagen und damit die Tumorprogression bei exokrinen Pankreastumoren?
5. Eignen sich in Vesikel verpackte miRNAs als potentielle Biomarker zur Diagnose oder Entwicklung neuer Therapieansätze in Pankreaskarzinomen?

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Laborgeräte

Geräte	Hersteller
AB 7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems by Life Technologies (Waltham, USA)
Autoclav systec DX-65	Systec the autoclave copmany (Linden, Deutschland)
Autoclav Systec VX-65	Systec the autoclave copmany (Linden, Deutschland)
Bioruptor® Pico sonication device	Diagenode innovating epigenetics solutions (Liège, Belgien)
Chemo Cam Imager	INTAS Imaging Sciences (Göttingen, Deutschland)
Eisbereiter Scotsman AF80	Hubbard Ice Systems (Ipswich, UK)
Eppendorf-Pipetten Discovery Comfort 1000 µL, 200 µL, 20 µL, 10 µL	Kinesis GmbH (Langenfeld, Deutschland)
Elektrophorese Power Supply EV261.	Biotec Fischer GmbH (Reiskirchen, Deutschland)
Fiberlite™ F15-6 x 100y Festwinkelrotor	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
Handzähler 4-stellig	Veeder-Root (Connecticut, USA) Katalognr.: 762304-001
Heracell 240i CO ₂ Inkubator	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
Heraeus Megafuge 8	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
Heraeus Megafuge 40R	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
Heraeus Multifuge 3 sr+ Zentrifuge	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
Herafreeze™ HFU T Series (- 80°C)	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
Kühlschrank/ Gefrierschrank Premium (4°C,- 20°C)	Liebherr (Bulle, Schweiz)
MLA-50 rotor, Festwickel	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
Multipipette® Plus	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Multiskan™ FC Mikrotiterplatten-Photometer	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)

Nanodrop 1000 Spektrophotometer	peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
Olympus IMT-2 Inverses Lichtmikroskop	Olympus Optical Co (Gerstetten, Deutschland)
Optima™ MAX-XP Ultrazentrifuge	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
Optima™ XPN-80 Ultrazentrifuge	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
Pipettierroboter acu	INTEGRA Biosciences AG (Zizers, Schweiz)
PMR-30 Compact Fixed-Angle Platform Rocker	Grant Instruments Ltd (Shepreth, Großbritannien)
SW 32 Ti Swinging-Bucket Rotor	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
Thermomixer 5436	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
T 100 Thermal Cycler	BioRad (CA, USA)
Tisch-Zentrifuge Heraeus Pico 21 Centrifuge	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
Tisch-Zentrifuge Mikro 200R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG (Tuttlingen, Deutschland)
Vortexer REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG (Schwabach, Deutschland)
Zählkammer Neubauer improved	Plan Optik AG (Elsoff, Deutschland)
Zellkultur Bench: Msc-Advantage 1.2	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Germany)
Zetaview®	Particle Metrix GmbH (Meerbusch, Deutschland)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
Adapter für 16 x76 mm Röhrchen (Beckman)	Beranek Laborgeräte (Weinheim, Deutschland)
Aluminium Kappe für Röhrchen 16 x76 mm	Beranek Laborgeräte (Weinheim, Deutschland)
CELLSTAR® Zellkultur Multiwell-Platten (6- und 12-Well Format)	Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
15 mL Falcons	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
50 mL Falcons	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Einfrierbox Mr. Frosty	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
Filterpapier MN 218B, Schwämme	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland)

Flaschen und Bechergläser	Duran Group GmbH (Wertheim/Main, Germany)
Formvar-Karbonfilm beschichtet EM grids, Kupfer	Ted Pella Inc. (CA, USA)
Handschuhe Nitril Skin M	Semperit Technische Produkte Gesellschaft m.b.H., Segment Sempermed (Wien, Österreich)
Immuno-Blot PVDF Membran für Protein Blot, 0,2 µm	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Low binding Reaktionsgefäße 2 mL	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
MicroAmp fast 96-Well Reaktionsplatte (qPCR)	Applied Biosystems by Life Technologies (Waltham, USA)
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems by Life Technologies (Waltham, USA)
Mikrotiterplatte 96-well, F (für MTT Assay)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Objektträger	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Pipettenspitzen 10 µL, 100 µL, 1000 µL	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Reaktionsgefäße 0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
SDS-Page/Blottingkammer	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
SDS-Page/Blotting-Gerät	Peqlab Biotechnologies GmbH (Erlangen, Deutschland)
Serologische Pipetten	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
TC Flaschen T75, T175	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
TC Flaschen T75 für Suspensionszellen	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
TC Platte 6-Well, 12-Well	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Thincert Zellkultur-Einsätze, Transparent Membran (PET), Porendurchmesser: 0,4 µm (für 6- and 12-Well Format)	Greiner Bio-One (Frickenhäusen, Deutschland)
Röhrchen, dickwandig, Polypropylen, 10 mL, 16 x 76 mm	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
Röhrchen, dickwandig, Polypropylen, 25 mL, 25 x 89 mm	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)

2.1.3 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 3: Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien/ Chemikalien	Hersteller
Acrylamid: Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Agarose Standard	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumpersulfat (APS)	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Ampuva	Fresenius KABI, (Bad Homburg, Deutschland)
Aqua dest.	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Bromphenolblau	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Dimethyl sulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Dithiothreitol (DTT)	Serva electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Dinatriumsalz Dihydrat	
Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol absolut (100%)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Glutaraldehyd-Lösung, 25%	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Glycerin Rotipuran, 99,5%	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
HEPES, 99,5%	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Glycin Pufferan	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Isopropanol	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
2-Merkaptoethanol	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Methanol ≥ 99.8%	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Methyl Zellulose	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Milchpulver blotting grade, fetarm	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Natriumfluorid	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Natriumdeoxycholat	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Natriumpyrophosphat (Na ₄ P ₂ O ₇)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Ortho V (Sod. O. Vanadate) Na ₃ VO ₄	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Oxal Säure	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

Paraphormaldehyd (PFA) 4%	Mephisto
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Protease-Arrest (100x)	G-Biosciences/ Geno Technologies (Illinois, USA)
Rotiphorese Gel 37, 5:1	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Roti®-Mount FluorCare DAPI	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Salzsäure 37% (rauchend)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Salzsäure (1M)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
SDS ultra pure	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Thiazolylblau	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Tris-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Tris (alkaline)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Triton-x-100 pure	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Tween 20	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

2.1.4 Standards

Tabelle 4: Standards

Standard	Hersteller
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder 10-180 kDa	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland) Katalognr.: 26616
Pierce™ Bovine Serum Albumin Standard Ampules, 2 mg/mL	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Germany) Katalognr.: 23209

2.1.5 Primer, siRNAs, TaqMan Gene Expression Assay, TaqMan Advanced MicroRNA Assays und miRNA Inhibitoren

Primer für real-time PCR

Alle hier verwendeten Primer wurden mit Hilfe der Software Primer Express V3.0 von Thermo Scientific entwickelt und bei der Firma biomers.net erworben.

Tabelle 5: Primer für die real-time PCR

Primer *	Sequenz
hCXCL9 for	5'-CCCACCCGAACGTCTTATCTAA-3'
hCXCL9 rev	5'-TGGGTACACAGACTCTCAAATTTATG-3'
hCXCL10 for	5'-ACGCTGTACCTGCATCAGCAT-3'
hCXCL10 rev	5'-CTCAACACGTGGACAAAATTGG-3'
hCCL-17 for	5'-CACCCCAGACTCCTGACTGTCT-3'
hCCL-17 rev	5'-GCTCTTCTTCGTCCTGGAA-3'
hCCL-13 for	5'-CAGCCAGATGCACTCAACGT-3'
hCCL-13 rev	5'-TGCTGGTGGTGATCACATAGC-3'
h/m XS13 for	5'-TGGGCAAGAACACCATGATG-3'
h/m XS13 rev	5'-AGTTTCTCCAGAGCTGGGTTGT-3'
hMannose-Rezeptor for	5'-TTGTTAAATATGGCAAAGCAGCTA-3'
hMannose-Rezeptor rev	5'-GCTGGCTATAAGGGAATTGTGAA-3'
hCCL-2 for	5'-CCCAAGCAGAAGTGGGTTCA-3'
hCCL-2 rev	5'-GCTGCAGATTCTTGGGTTGTG-3'
hCCL-22 for	5'-CAGGTAAAGGACATAAATGTTACAAGTGT-3'
hCCL-22 rev	5'-AAATGGCCTCCTCCAATTCC-3'
hCCL18 for	5'-TACATTCAATGCATGGATCAATCA-3'
hCCL18 rev	5'-GCTGAGCAAAACCATTCAATAAAGA-3'

* h – Human m-Maus

Primer für die cDNA-Synthese

Tabelle 6: Primer für die cDNA-Synthese

Primer	Sequenz
Oligo dT	5'-TTTTTTTTTTTTTTT-3' (15 x T)

TaqMan Gene Expression Assays und siRNAs

Tabelle 7: TaqMan Gene Expression Assays und siRNAs

Gen	Assay	Hersteller
IGF2 Assay ID.: Hs01005963_m1	Taqman Gene Expression Assay	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
RPLP0 Assay ID.: Hs00420895_gH	Taqman Gene Expression Assay	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
IGF2 siRNA 1 SiRNA ID.: 217672	Silencer Pre-designed siRNA Produkt	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
IGF2 siRNA 2 SiRNA ID.: 254539	Silencer Pre-designed siRNA Produkt	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
IGF2 siRNA 3	Silencer Pre-designed	Thermo Scientific, Life

SiRNA ID.: 254540	siRNA Produkt	Technologies (Dreieich, Deutschland)
18s5 rRNA Assay ID: Hs03928985_g1	Taqman Gene Expression Assay	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
Negative Control siRNA (20 nmol) Katalognr.: 1027310	siRNA negative control für RNAi Experimente	Quiagen (Hilden, Deutschland)

TaqMan Advanced MicroRNA Assays und miRNA Inhibitors

Tabelle 8: TaqMan Advanced MicoRNA Assays und miRNA-Inhibitoren

miRNA	Assay	Hersteller
hsa-miR-8078 Assay ID: 480620_mir	TaqMan Advanced MicroRNA Assay	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
hsa-miR-5787 Assay ID: 480167_mir	TaqMan Advanced MicroRNA Assay	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
has-miR-4497 Assay ID: 479836_mir	TaqMan Advanced MicroRNA Assay	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
has-miR-6724-5p Assay ID: 480232_mir	TaqMan Advanced MicroRNA Assay	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
hsa-miR-5787 Assay ID: AM26028	Ambio Anti-miR miRNA Inhibitor	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
has-miR-4497 Assay ID: AM22699	Ambio Anti-miR miRNA Inhibitor	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
has-miR-6724-5p Assay ID: AM25379	Ambio Anti-miR miRNA Inhibitor	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
mirVana miRNA Inhibitor Negative control 1 (20 nmol) Katalognr.: 4464077	Ambion mirVana miRNA Inhibitor	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)

2.1.6 Antikörper

Primäre Antikörper

Tabelle 9: primäre Antikörper

Antikörper	Methode	Verdünnung in Magermilch 5%	Organis- mus	Spezifität	Hesteller
Anti-β-Actin –Peroxidase Antikörper Klon AC-15	Western Blot	1:40000	mouse, monoclonal	Meerschwein, Hund, Blutegel, Katze, Schwein, Karpfen, Maus, Huhn, Hase, Schaf, Ratte, Mensch, Rind	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) Katalognr.: A3854
Anti-CD63 antibody [EPR5702], 0,362 mg/mL	Western Blot	1:1000	Rabbit, monoclonal	Mensch	Abcam (Massachuset ts,USA) Katalognr.: ab134045 BD
Purified Mouse anti- GM130, 250 µg/mL	Western Blot	1:500	mouse IgG1 κ	Ratte, Mensch, Mause, Hund	Biosciences (Massachuset ts,USA) Katalognr.: 610822 BD
Purified Mouse Anti- TSG101, 250 µg/mL	Western Blot	1:1000	mouse IgG1	Mensch, Maus, Ratte, Hund	Biosciences (Massachuset ts,USA) Katalognr.: 612696 BD
Purified Mouse Anti- Flotillin, 250 µg/mL	Western Blot	1:20000	mouse IgG1	Ratte, Mensch, Maus, Huhn	Biosciences (Massachuset ts,USA) Katalognr.: 610820
Anti-Acetyl- Histone 3- Antibody, 100 µg	Western Blot	1:1000	rabbit IgG	Mensch, Maus, Ratte	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) Katalognr.: 06-599 Abcam
Anti-IGF2 antibody	Western Blot	1:100	Rabbit IgG	Maus, Mensch	(Massachuset ts,USA) Katalognr.:

Sekundäre Antikörper**Tabelle 10: sekundäre Antikörper**

Antikörper	Organismus	Spezifität	Hersteller
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Ziege	Kaninchen	Cell signaling (Massachusetts,USA) Katalognr.: 7074P2
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	Pferd	Maus	Cell signaling (Massachusetts,USA) Katalognr.: 7076P2

2.1.7 Reagenzsysteme und Kits**Tabelle 11: Reagenzsysteme und Kits**

Reagenz/Kit	Anwendung	Hersteller
Clarity™ Western ECL Substrat	Western Blot	BioRad Laboratories GmbH (Rüdigheim, Deutschland) Katalognr.: 1705060
Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit	Proteinbestimmung	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland) Katalognr.: 23236
Roti®-Mount FluorCare DAPI	Kernfärbung zur Überprüfung auf Mycoplasmen	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) Katalognr.: HP20.1
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) Mix, 10 mM	cDNA-Synthese	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland) Katalognr.: 331520
Ficoll-Paque™ Plus	PBMC-Isolation	GE Healthcare (Massachusetts,USA) Katalognr.:17-1440-02
iTaq Universal SYBR® Green Supermix	PCR	BioRad Laboratories GmbH (Rüdigheim, Deutschland) Katalognr.: 1725124
mirVana™ PARIS™ Kit	RNA-Isolation	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland) Katalognr.: AM1556
Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent	Transfektion von Zellen	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)

Omniscript RT Kit	cDNA-Synthese	Katalognr.: 13778100 Quiagen (Hilden, Deutschland) Katalognr.: 205113
peqGOLD Total RNA Kit	RNA-Isolation	Peqlab Biotechnologies GmbH (Erlangen, Deutschland) Katalognr.: 732-2868
TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit	cDNA-Synthese	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland) Katalognr.: A28007
TaqMan™ Fast Advanced Master Mix	PCR	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland) Katalognr.: 4444557
Western Lighting® Ultra	Western Blot	Perkin-Elmer (Krakow ,Polen) Katalognr.: NEL111001EA

2.1.8 Nährmedien und zusätzliche Bestandteile

Tabelle 12: Nährmedien und zusätzliche Bestandteile

Produkt	Hersteller
Dulbeccos Phosphate buffered saline (PBS) 1x	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland) Katalog nr.: 14190250
Fetal Calf Serum (FCS)	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
Gentamicinsulfat	Lonza Group Ltd (Basel, Schweiz) Katalognr.: 17-528Z
Hank's Salt Solution (HBSS) mit 0,35 g/L NaHCO ₃	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) Katalognr.: L2035
Human Interferon-Gamma (IFN γ)	PeptoTech GmbH (Hamburg, Deutschland) Katalognr.: 300-02
Human Serum AB	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) H4522-100ML
β -Estradiol	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) Katalognr.: E8875-250MG
Gemcitabine	Angefordert aus dem Chemoterapiezentrum des Universitäts-Klinikums Gießen- Marburg, Standort Marburg Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) Katalognr.: G-4177

Lipopolysaccharide (LPS E.Coli 0127:B8)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) Katalognr.: L3129-10MG
<i>minimum essential media</i> (MEM) Non-Essential Amino Acids Solution (100x)	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland) Katalognr.: 11140035
Natriumpyruvat 100 mM (100x)	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland) Katalognr.: 11360070
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) Katalognr.: P1585-1MG
Recombinant Human Interleukin-3 (IL-3)	PeproTech GmbH (Hamburg, Deutschland) Katalognr.: 200-03
Recombinant Human Interleukin-4 (IL-4)	PeproTech GmbH (Hamburg, Deutschland) Katalognr.: 200-04
Recombinant Human Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF)	PeproTech GmbH (Hamburg, Deutschland) Katalognr.: 300-25
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 + L-Glutamin	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland) Katalognr.: 21875-091
0,5% Trypsin-EDTA (10x)	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland) Katalognr.: 15400054

2.1.9 Säugerzelllinien

Alle Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen mittels DAPI Färbung auf eine Mycoplasmen-Kontamination geprüft.

Tabelle 13: Säugerzelllinien

Zelllinie	Abstammung	Herkunft	Kultivierungsmedium	Referenz
S2-007	Humane duktale Pankreaskarzinom-Zelllinie (Lebermetastase), adhärent	T Iwamura (medizinische Hochschule Miyazaki, Miyazaki, Japan)	RPMI + 5% FCS + 5 mL Pyruvat + 2,5 mL Gentamicin	(Taniguchi, Iwamura, and Katsuki 1992)
PaTu 8988t	Humane duktale Pankreaskarzinom-Zelllinie, adhärent	H. P. Elsässer (Institut für Zytobiologie and Zytopathologie, Philipps Universität, Marburg, Deutschland)	RPMI + 5% FCS + 5 mL Pyruvat + 2,5 mL Gentamicin	(Elsässer et al. 1992)
Panc1	Humane duktale Pankreaskarzinom-Zelllinie, adhärent	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland)	RPMI + 10% FCS + 5 mL Pyruvat + 2,5 mL Gentamicin	(Evans et al. 2010)
LON 556	Primäre Humane duktale Pankreaskarzinom-Zelllinie, adhärent	etabliert von Prof. Dr. C. Heeschen, Queen-Mary-University, London	RPMI + 10% FCS + 5 mL Pyruvate + 2,5 mL Gentamicin	-
LON 560	Primäre Humane duktale Pankreaskarzinom-Zelllinie, adhärent	etabliert von Prof. Dr. C. Heeschen, Queen-Mary-University, London	RPMI + 10% FCS + 5 mL Pyruvat + 2,5 mL Gentamicin	-
THP1	Humane Monozyten-zelllinie, Suspension	ATCC-TIB-202	RPMI + 10% FCS + 5 mL Pyruvat + 2,5 mL Gentamicin	(Tsuchiya et al. 1980)
BlaER1	Humane B Zelllinie, Suspension	Centre de Regulació Genòmica, Baelona	RPMI + 10% FCS + 2,5 mL Gentamicin	(Rapino et al. 2013)
buffy coats		Angefordert aus der Blutbank des Universitäts-Klinikums Gießen-Marburg, Standort Gießen		

2.1.10 Puffer und Lösungen

Tabelle 14: Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösungen/ Medien	Herstellung
10% APS	1 g Ammoniumpersulfat + 10 mL dest. Wasser (500 µL aliquots)
10x Blottingpuffer 1 L	30,3 g Tris Base/1 L (250 nM Tris Base) + 144,1 g Glycin/ 1 L (1,92 M Glycin) auf 1 L mit dest. Wasser auffüllen.
1x Blottingpuffer 1 L	100 mL 10x Blotting Puffer + 200 mL Methanol auf 1 L mit dest. Wasser auffüllen.
DTT	154,25 g/1 L; Arbeitslösung 1M → in 500 µL Aliquots abfüllen
1% EDTA	1 g EDTA + 100 mL Aqua dest.
Elutiation Puffer	1 mL human AB Serum + 1 mL EDTA (1%) + 100 mL 10x PBS + 1 L dest. Wasser.
Erythrozyten-Lysepuffer	8,2 g (155 mM NaCl) + 1,02 g (10 mM KHCO ₃) + 0,03 g (0,1 mM EDTA) auf 1 L dest. Wasser auffüllen. pH = 7,3
70% Ethanol (100ml)	70 mL Ethanol absolut (100%) + 30 mL dest. Wasser.
Glutaraldehyd 1%	1 mL Glutaraldehyd (25%) in 24 mL 0,1 M PBS, pH 7,4 lösen.
10x Laufpuffer 1 L	30,3 g Tris/ 1L (250 nM Tris Base) + 144 g Glycin/ 1L (1,92 M Glycin) + 10 g SDS (1% SDS) auf 1 L mit dest. Wasser auffüllen.
1x Laufpuffer 1 L	100 mL 10x Laufpuffer auf 1 L mit dest. Wasser auffüllen.
2% Methyl-Zellulose	196 mL dest. Wasser auf 90°C erhitzen. 4 g Methyl Zellulose zugeben und über Nacht bei 4°C mischen. Anschließend 3 Tage bei 4°C stehen lassen und danach mit dest. Wasser auf 200 mL auffüllen. Lösung 95 min. bei 4°C und 100000 x g zentrifugieren. Den Überstand abnehmen und in eine neue Flasche füllen. 3 Monate bei 4°C haltbar.
Methyl-Zellulose- Uranylacetate, pH 4	9 Teile 2% Methyl-Zellulose und 1 Teil 4% Uranylacetate, kurz vor Benutzung mischen.
MTT-Reagenz	150 mg Thiazolylblu + 30 mL PBS (1 mL aliquots)
MTT-Solubilisierungslösung	40 mL Isopropanol + 5 mL Triton-X-100 + 5 mL HCl (1M)

Magermilch Lösung (5%)	2 g Milchpulver + 40 mL TBST
1x Lysepuffer	12,5 mL (1 M HEPES PH 7,5) + 7,5 mL (5M NaCl) + 1,25 mL (200 mM EGTA) + 25 mL 100% Glycerin + 2,5 mL Triton x-100 + 1,05 g NaF (10 mM) Auf 250 mL mit dest. Wasser auffüllen. Zur Benutzung: 960 µL Stammlösung + 20 µL Na ₃ VO ₄ + 10 µL PMFS + 10µL 100x Protease Arrest.
1x RIPA-Puffer (Lysepuffer)	5 mL Tris-HCl (1M) 50 mM + 3 mL NaCl (5 M) 150 mM + 10 mL Triton x-100 10% + 1g Sodium-deoxycholat 1 % + 0,5 mL SDS (20%) 0,1% + 4 mL EDTA (0,25 M) 10 mM + 5 mL EGTA (0,2 M) 10 mM, pH 7,2 Auf 1 L mit dest. Wasser auffüllen.
Primär Makrophagen Basismedium	500 mL RPMI (bereits supplementiert mit L-Glutamin) + 0,5% Gentamycin (2,5 mL) + 1% AS (5 mL)
Primär Makrophagen Differenzierung Medium	Basismedium + 5% Human AB Serum und 75 ng/mL RhM-CSF
Primär Makrophagen-Polarisationsmedium	Basismedium + 2% Human AB serum + 75 ng/mL RhM-CSF
Sammelgelpuffer 100 mL	6,06 g Tris/100 mL (0,5M Tris Base) + 2 mL 20% SDS/ 100 mL (0,4% SDS), PH 6,8 Auf 100 mL mit dest. Wasser auffüllen.
Sammelgellösung 100 mL	25 mL Sammelgelpuffer + 59 mL dest. Wasser + 16 mL Acrylamid
Sammelgel (für 2 Gele)	5 mL Sammelgellösung + 14 µL APS + 14 µL TEMED
4x SDS Ladepuffer 50 mL	2 g Tris HCL (235 mM) + 25 g Bromphenolblau + 25 mL dest. Wasser + Glycerol + 5 mL 20% SDS (2% SDS), pH 6,8 Auf 1 L mit dest. Wasser auffüllen.
Trenngel 10% (für 2 Gele)	2,5 mL Trenngelpuffer + 4,2 mL dest. Wasser + 3,3 mL Acrylamid + 24 µL APS + 24 µL TEMED
Trenngel 12% (für 2 Gele)	2,5 mL Trenngelpuffer + 3,5 mL dest. Wasser + 4 mL Acrylamid + 24 µL APS + 24 µL TEMED
Trenngel 15% (für 2 Gele)	2,5 mL Trenngelpuffer + 2 mL dest. Wasser + 5 mL Acrylamid + 24 µL APS + 24 µL TEMED
Trenngelpuffer 100 ml	18,17 g Tris/100 mL (1,5M Tris Base) + 2 mL 20% SDS/100 mL (0,4% SDS), pH 8,8 Auf 100 mL mit dest. Wasser auffüllen.
10x TBS 1 L	42,2 g Tris Base /1L + 80 g NaCl/1L + 15 mL HCl (37%), PH 7,6 Auf 1 L mit dest. Wasser auffüllen.
1x TBS-Tween 1 L	100 mL 10x TBS + 1 mL Tween 20 Auf 1 L mit dest. Wasser auffüllen.

1x TBS- Triton-X-100 1 L	100 mL 10x TBS + 1 mL Triton-X-100 Auf 1 L mit dest. Wasser auffüllen.
4% Uranylacetat pH 4	4 g Uranylacetate in 50 mL dest. Wasser lösen. 4 Monate bei 4°C halbar. Vor Licht geschützt lagern. Die jeweilige Menge vor Gebrauch durch einen 0,22 µm Filter filtrieren.
Uranyl-Oxalate, pH 7	4% Uranylacetat, pH 4 mit 0,15 M Lösung Oxal Säure (0,495 g in 50 mL dest. Wasser) im Verhältnis 1:1 Im Dunkeln lagern bei 4°C, 1 Monat haltbar

2.1.11 Computerprogramme

Tabelle 15: Computerprogramme

Programm	Hersteller
Basic Local Alignment Tool (BLAST)	National Center for Biotechnology Information (NCBI) (MD, USA)
Primer Express™ Software v3.0	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
Real time Software	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
GraphPad Prism 5	GraphPad Software (CA, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Zellkulturmethoden

Kultivierung von humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien und humanen Monozyt- bzw. B-Zelllinien

Die humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien (S2-007, PaTu 8988t, LON 556, LON 560) und die humane Monozyt-Zelllinie THP1 als auch die humane B-Zelllinie wurden in einem Zellinkubator mit 5% CO₂ bei 37°C kultiviert. Für die Kultivierung der Zellen wurde als Standardmedium RPMI 1640 verwendet. Zu diesem wurden noch 5% FCS für S2-007 und PaTu 8988t bzw. 10% FCS für LON 556, LON 560, THP1- und BlaER1-Zellen sowie 1% Pyruvat und 2,5% Gentamicin hinzugefügt.

Passagieren von Zellen

Die humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien bzw. die humane Monozyt- und B-Zelllinie wurden passagiert, wenn diese eine Konfluenz bzw. Dichte von 80-90% erreicht hatten. Dafür wurde bei den adhärent wachsenden Zellen zunächst das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit einer ausreichenden Menge an PBS gewaschen. Anschließend wurden 2 mL Trypsin/EDTA zu den Zellen gegeben und für ca. 5 Minuten im Zellinkubator bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Enzymreaktion mit 3 mL des für die jeweilige Zelllinie entsprechenden Mediums abgestoppt, die Zellen ausreichend resuspendiert und die Zellsuspension in ein 15 mL Falcon überführt. Von dieser Zellsuspension wurden ca. 0,5 bis 1 mL in eine neue TC75 Flasche mit 10 mL Zellkulturmedium ausgesät. Zum Passagieren der humanen Monozyt- und B-Zelllinie wurden ca. 2 mL Zellsuspension in eine neue TC75 Flasche mit 10 mL Zellkulturmedium überführt.

Bestimmung der Zellzahl

Zum Ansetzen neuer Experimente wurde von der verbleibenden Zellsuspension die Gesamtzellzahl bestimmt. Von der Zellsuspension wurden dafür 10 µL abgenommen und mit 30 µL Medium oder Trypanblau versetzt (Verdünnung: 1:4). Anschließend wurden 10 µL von diesem Ansatz in eine Neubauer Zählkammer (Kammerfaktor 10⁴/mL) überführt und alle Zellen in den vier Quadranten unter dem Mikroskop gezählt.

Danach konnte die Gesamtzellzahl an Hand der nachfolgenden Formeln berechnet werden.

$$\text{Anzahl gezählter Zellen} \times 10^4 = \text{Zellzahl/mL}$$

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden adhärenzte Zellen zunächst trypsiniert. Die abgelösten Zellen wurden dann für drei Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Mediumüberstandes wurde das Zellpellet in Einfriermedium (RPMI Medium + 10% FCS + 10% DMSO) aufgenommen, resuspendiert und je 1 mL der Zellsuspension in Kryo-Gefäße überführt. Die Kryo-Gefäße wurden dann in eine Einfrierbox überführt und für 24 Stunden bei -80°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Kryo-Gefäße in den flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryo-Gefäß aus dem flüssigen Stickstoffs entnommen, schnell aufgetaut und die Zellsuspension in eine neue TC75 Flasche mit 20 mL 37 °C vorgewärmten Medium entsprechend der Zelllinie ausgesät. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen bis zur nächsten Passage weiter kultiviert.

2.2.2 Methoden im Umgang mit Nukleinsäuren

a) RNA-Isolation (peqGOLD Total RNA Kit)

Die *ribonucleic acid*- (RNA) Isolation erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers wie folgt. Zu jedem Well wurden 400 µL RNA Lyse Puffer T hinzugefügt und alles auf eine DNA-removing Säule gegeben. Die Säulen wurden eine Minute bei 12000 x g zentrifugiert, der Durchfluss mit 400 µL 70%igen Ethanol gut gemischt und auf eine perfect-bind-RNA-Säule pipettiert. Die perfect-bind-RNA-Säulen wurden dann eine Minute bei 10000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Durchfluss verworfen und die Säule mit 500 µL Wasch Puffer I gewaschen. Nach 15 Sekunden Zentrifugation bei 10000 x g wurde der Durchfluss erneut verworfen und die Säule ein zweites Mal mit 600 µL Wasch Puffer II gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 10000 x g für 15 Sekunden wurde der Durchfluss verworfen und die Säule für zwei Minuten bei 10000 x g getrocknet. Die Säule wurde danach in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zum Schluss wurden 35 µL 50 °C warmes RNase freies Wasser direkt auf die

Säule pipettiert und die RNA durch eine einminütige Zentrifugation bei 500 x g von der Säule eluiert. Für eine bessere RNA-Ausbeute wurde der letzte Schritt ein zweites Mal mit dem erhaltenen Eluat wiederholt. Abschließend wurde die RNA-Konzentration in ng/μL mittels NanoDrop 1000 bestimmt.

b) RNA-Isolation (mirVana™ PARIST™ RNA und Native Protein Purification Kit)

Die RNA-Isolation erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers wie folgt. Die Vesikelpellets bzw. Zellpellets wurden in je 100 μL cell disruption Puffer lysiert und in ein neues Reaktionsgefäß mit je 100 μL 2x Denaturierungslösung überführt, alles sofort gut gemischt und für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden 200 μL Acis-Phenol: Chloroform zu den Proben gegeben alles für 30 bis 60 Sekunden gemischt und die Proben zur Phasentrennung fünf Minuten bei > 10000 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die obere wässrige Phase vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt, das abgenommene Volumen bestimmt und die 1,25-fache Menge an 100% Ethanol zu den Proben gegeben. Das Gemisch wurde dann auf die Säuleneinheit pipettiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 10000 x g für 30 Sekunden wurde der Durchfluss verworfen und die Säule mit je 700 μL Waschlösung 1 gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 10000 x g für 30 Sekunden wurde der Durchfluss erneut verworfen und die Säule zwei Mal mit 500 μL Waschlösung 2/3 gewaschen. Anschließend wurde die Säule für eine Minute bei 10000 x g trocken zentrifugiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 15 μL (für Exosomen) bzw. 30 μL (für Zelllysate) der zuvor auf 95 °C erhitzten Elutionslösung wurden auf die Säuleneinheit gegeben und die RNA durch die Zentrifugation für eine Minute bei 10000 x g eluiert. Für eine bessere RNA-Ausbeute wurde der letzte Schritt ein zweites Mal mit dem erhaltenen Eluat wiederholt. Abschließend wurde die RNA-Konzentration in ng/μL mittels NanoDrop 1000 bestimmt.

c) cDNA-Synthese (omniscip RT Kit)

Es wurden 100-500 ng RNA mit RNase freiem Wasser auf ein Endvolumen von 14,1 μL verdünnt. Danach wurden 5,9 μL des Mastermixes (Tabelle: 16) zu der verdünnten RNA pipettiert und alles für 90 Minuten bei 37 °C inkubiert. Für jede *complementary deoxyribonucleic acid* (cDNA)-Synthese wurde je eine Wasserkontrolle und je eine -RT-Kontrolle (cDNA-Synthese ohne reverse Transkriptase) mitgeführt.

Tabelle 16: Mastermix für eine Probe Omniscript

Die Tabelle 16 zeigt die Zusammensetzung des Mastermixes für die cDNA-Synthese für eine Probe.

Kit Komponenten	Volumen in [μ L]
Aqua dest.	1,0
Reverse Transkriptase	0,5
dNTPs (5 mM)	2,0
10 x Puffer	2,0
Oligo (dt) Primer	0,4

d) cDNA-Synthese für die Quantifizierung von miRNAs (TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit)

Die cDNA-Synthese erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers wie folgt. Als erster Schritt wurde eine Poly-A-tailing Reaktion durchgeführt. Lediglich bei Vesikel-RNA-Proben wurde das gesamte Volumen an isolierter RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt. Bei Zellproben hingegen wurden 2 μ L (max. 5 ng/ μ L) RNA-Probe verwendet. 3 μ L Poly-A-Reaktionsmix wurden mit der RNA gemischt, kurz zentrifugiert und für 45 Minuten bei 37 °C in einem Thermal Cycler von (BioRad) inkubiert und die Reaktion für 10 Minuten bei 65°C abgestoppt. Anschließend wurde das Poly-A-Konstrukt mittels Ligation an die RNA-Proben geheftet. 10 μ L des Ligation-Reaktionsmixes wurden zu den Proben pipettiert und alles im Thermal Cycler für 60 Minuten bei 16 °C inkubiert. Danach folgte der reverse Transkriptionsschritt. Hier wurden 15 μ L RT-Reaktionsmix zu den Proben pipettiert, alles 15 Minuten bei 42 °C inkubiert und die Reaktion für 5 Minuten bei 85 °C abgestoppt. Zum Abschluss wurde noch eine miRNA-Amplifikationsreaktion durchgeführt. Dafür wurden 45 μ L miRNA-Amp-Reaktionsmix und 5 μ L RT-Reaktionsprodukt gemischt, kurz zentrifugiert und folgende Geräteeinstellungen am Thermal cycler eingestellt (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Geräteeinstellungen für die miRNA-Amplifikationsreaktion

Die Tabelle 17 zeigt die jeweiligen Geräteeinstellungen am Thermal cycler für die Durchführung der miRNA-Amplifikation.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Enzym Aktivierung	95 °C	5 Minuten	1
Denaturierung	95 °C	3 Sekunden	14
Anneal/Extend	60 °C	30 Sekunden	
Stoppreaktion	99 °C	10 Minuten	1
halten	4 °C	halten	1

e) Quantifizierung von mRNAs und miRNAs mittels real-time PCR

e 1) Real-time PCR mit SYBR®Green

Für die real time *polymerase chain reaction* (PCR) wurden die cDNAs im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. verdünnt. 1 µL Probe wurde in eine 96-Well-Platte pipettiert, mit 19 µL SYBR®Green PCR-Master-Mix (Tabelle: 18) gemischt und mit einer Klebefolie abgedichtet. Die 96Well-Platte wurde für fünf Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert.

Tabelle 18: Mastermix für eine Probe SYBR®Green

Die Tabelle 18 zeigt die Zusammensetzung des Mastermixes für eine Probe für die PCR.

Komponenten	Volumen in [µL]
Aqua dest.	8,6
SYBR®Green PCR-Master-Mix (2x)	10,0
Forward primer (diluted 1:10 in Aqua dest)	0,2
Reverse primer (diluted 1:10 in Aqua dest)	0,2

Alle Primersequenzen wurden mit Hilfe der Software Primer Express V3.0 von Thermo Scientific entwickelt und deren Spezifität mit dem Basic Local Alignment Tool (BLAST) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) getestet. Die RNA-Quantifizierung in der 96-Well-Platte wurde mit dem 7500 Fast Real-time PCR System durchgeführt. Dafür wurde der Run Mode: Standard 7500 und in der Auswahl Sybr Green als Detektor ausgewählt und folgende Geräteparameter für die PCR eingestellt (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19: Geräteeinstellung für PCR Reaktion SYBR®Green

Die Tabelle 19 zeigt die jeweiligen Geräteeinstellungen für das 7500 Fast Real-time PCR System.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
AmpErase® UNG Activation	50 °C	2 Minuten	1
Enzymaktivierung	95 °C	20 Sekunden	1
Denaturierung	95 °C	3 Sekunden	40
Anneal/ Extend	60 °C	30 Sekunden	
Schmelzkurvenanalyse	95 °C	15 Sekunden	
	60 °C	60 Minuten	
	95 °C	15 Sekunden	
	60 °C	15 Sekunden	

Zur Auswertung der relativen Genexpression wurde die $2^{-\Delta CT}$ Methode angewandt. Als Haushaltsgen diente RPLP0. Zunächst wurde der ΔCT -Wert berechnet indem der CT-Wert des Referenzgenes (RPLP0) vom CT-Wert des zu detektierenden Genes abgezogen wurde.

$$\Delta CT = CT (\text{Targetgen}) - CT (\text{House Keeping Gen})$$

Die relative Genexpression wurde daraufhin nach nachfolgender Formel bestimmt.

$$\text{relative gene expression level} = 2^{-\Delta CT}$$

e 2) real-time PCR mit TaqMan-Sonden

Im Gegensatz zur PCR mit SYBR®Green wurden 2 µL 1:10 verdünnte cDNA in die 96 Well Platte vorgelegt und mit je 18 µL Mastermix gemischt. Die 96-Well-Platte wurde in das Gerät gestellt, der Run Mode Fast 7500 und FAM Als Detektorsonde ausgewählt. In den nachfolgenden Tabellen 20 und 21 sind die Zusammensetzung des Mastermixes und die entsprechenden Geräteeinstellungen für das 7500 Fast Real-time PCR System dargestellt. Die Auswertung erfolgte wie unter e1) beschrieben.

Tabelle 20: Mastermix für eine Probe TaqMan-Sonden

Die Tabelle 20 zeigt die Zusammensetzung des Mastermixes für eine Probe für die PCR.

Komponenten	Master Mix 1x Volume [µL]
TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2x)	10,0
TaqMan® Gene Expression Assay IGF2-FAM (20x)	1,0
Aqua dest.	7,0

Tabelle 21: Geräteeinstellungen für PCR Reaktion TaqMan-Sonden

Die Tabelle 21 zeigt die Geräteeinstellungen für das 7500 Fast Real-time PCR System.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Enzymaktivierung	95 °C	2 Minuten	1
Denaturierung	95 °C	3 Sekunden	40
Anneal/ Extend	60 °C	30 Sekunden	

2.2.3 Proteinchemische Methoden**Generierung von Gesamtzelllysats und Lysat aus extrazellulären Vesikeln**

Der RIPA-Puffer wurde vor der Verwendung frisch mit 1x Protein Inhibitor Cocktail (Na_3VO_4 , PMFS und 100x Protease Arrest) versetzt.

Die in RIPA-Puffer gelösten Vesikel-Pellets wurden in einem Ultraschalbad vier Mal für 30 Sekunden mit hoher Energie lysiert. Dazwischen erfolgte jeweils eine 30 sekundige Pause.

Für die Gewinnung des Gesamtzelllysats wurden die Zellen durch Trypsinierung gelöst und bei 300 x g für vier Minuten pelletiert. Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in ca. 50 – 80 μL RIPA-Puffer oder Lysepuffer resuspendiert und 20 Minuten inkubiert. Wurden die Zelllysate als Kontrolle für die Vesikel-Proben benötigt, so wurden diese wie die Vesikel mittels Ultraschalbad lysiert.

Um nicht-lösliche Bestandteile von den löslichen Proteinen abzutrennen, wurde das Zelllysats bzw. das Vesikel-Lysat für zehn Minuten bei 14000 x g zentrifugiert und der Überstand mit den löslichen Proteinen in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach folgte die Bestimmung der Proteinkonzentration durch die Methode nach Bradford (Bradford 1976).

Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA Protein Assay

Zuerst wurden 200 μL Bradford-Lösung, 2 μL RIPA-Puffer oder Lysepuffer und 1 bis 5 μL bovine serum albumin (BSA) für die Standardkurve in eine 96-Well-Platte pipettiert. Für die Protein-Proben wurden je 200 μL Bradford-Lösung in die Platte vorgelegt und je 2 μL Protein-Probe zugegeben und gut gemischt. Die Platte wurde dann für fünf bis zehn Minuten im Dunkeln inkubiert und anschließend die optische Dichte bei 597 nm bestimmt. Die Standardkurve wurde gegen die entsprechende Konzentration

aufgetragen um so mit Hilfe der linearen Funktion die Proteinkonzentrationen in den Proben zu berechnen.

Immunoblot-Analyse

Bevor das Gel mit den Proben beladen werden konnte, wurden je Probe 50 μL Proteinlysate mit 7 μL DTT und 16 μL 4x SDS (Probenpuffer + Farbstoff) gemischt und für fünf Minuten bei 95°C inkubiert. Für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese wurden 10%, 12% oder 15% Gele verwendet. Um eine schärfere Trennschicht zwischen Trenn- und Sammelgel zu erhalten, wurde das noch nicht polymerisierte Trenngel in die vorbereitete Gellkassette pipettiert und mit Ethanol überschichtet. Nach der vollständigen Polymerisation des Trenngels wurde das Ethanol abgegossen und das Trenngel mit Sammelgel überschichtet. Nach Fertigstellung des Gels wurde die Gellkassette in die Gelkammer gestellt und mit 1x SDS Laufpuffer befüllt. In die Taschen des Gels wurden 5 μL Marker (10 - 250 kDa), 10 μg - 15 μg Zelllysatsprobe oder 30 μL Vesikel-Probe geladen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei 120 - 160 V und 40 mA. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend nach dem wet-Blotting-Verfahren auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran, welche zuvor kurz mit Methanol aktiviert wurde, oder auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Übertragung der Proteine erfolgte je nach Größe für 60 bis 130 Minuten bei 300 mA und 4°C.

Nach Abschluss des Blotting-Prozesses wurde die Membran für eine Stunde in 5% Magermilch Lösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurde die Membran mit einem primären Antikörper bei 4°C über Nacht auf einem Schüttler inkubiert (Puffer und Konzentration des Antikörpers siehe Tabelle 9). Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal mit TBS-T gewaschen und für eine Stunde mit einem geeigneten horseradish peroxidase (HRP) gekoppelten sekundären Antikörper (1:10000) in 5% Magermilch Suspension bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran erneut drei Mal mit TBS-T gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte durch das *enhanced chemoluminescence* (ECL) Ultra Substrat und dem ChemoCam Imager.

2.2.4 M1/M2 Polarisation

a) von primärer humanen Makrophagen

Isolation von PBMCs aus buffy coats mit Ficoll-Gradientenzentrifugation

Zur Gewinnung von *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) wurde je 13 mL Ficoll in je drei 50 mL Röhrchen vorgelegt und mit 25 mL Blut vorsichtig überschichtet. Dabei sollte sich das Blut nicht mit dem Ficoll vermischen. Die Röhrchen wurden bei 800 x g für 30 Minuten bei abgeschalteter Bremse zentrifugiert. Danach wurde die oberste Plasmaschicht mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Die mittlere weiße Schicht, welche die PBMCs enthielt, wurde von allen drei Röhrchen mit Hilfe einer Pipette abgenommen, in einem neuen 50 mL Röhrchen gesammelt und in 40 mL kaltem PBS resuspendiert. Es folgten zwei Waschschrte mit je 40 mL kaltem PBS bei 160 x g für zehn Minuten bei 4°C. Anschließend wurde das Pellet zwei Mal für je fünf Minuten in 10 mL Erythrozytenlysepuffer inkubiert und jeweils für zehn Minuten bei 160 x g bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet in 30 - 35 mL kaltem PBS resuspendiert.

Isolation der Monozytenfraktion aus PBMCs mittel Elutriation

Die Isolation primärer humaner Monozyten aus der PBMC-Fraktion eines buffy coats, erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Andreas Kaufmann (AG Bauer/Kaufmann, Immunologie, Philipps-Universität Marburg). Nach der Isolation der PBMC-Fraktion aus buffy coats erfolgte eine Elutriation zur Anreicherung von humanen primären Monozyten (Wahl et al. 1984). Für die Elutriation wurde ein bereits sterilisierter und kalibrierter Elutriationsrotor (JE-5B) bei voller Pumpleistung mit Elutriationspuffer gespült. Bei 300 rpm wurde die PBMC-Fraktion bei sechs mL/min in die Elutriationskammer gepumpt. Danach erfolgte die Elutriation von verschiedenen Fraktionen bei 300 rpm und gleichzeitig zunehmender Pumpleistung. Bei einer Pumpleistung von 28,5 mL/min und einer potentiometrischen Dichte von 660 wurden zwei Mal 50 mL Zelllösung aufgefangen und sofort auf Eis gelagert. Nach der Elutriation wurde die Zellsuspension sieben Minuten bei 1300 rpm und 4°C zentrifugiert und die beiden Zellpellets in je 2 mL Differenzierungsmedium resuspendiert und zusammengeführt. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt.

Reifung von Monozyten zu primär humanen Makrophagen und M1/ M2 Polarisation

Zur Reifung der Monozyten zu Makrophagen wurden je 3×10^6 Zellen in 2 mL Differenzierungsmedium in je zwei 6-Well-Platten gesät. Nach vier Tagen wurde das Medium gewechselt. Nach weiteren vier Tagen erfolgte erneut ein Mediumwechsel mit je 2 mL Polarisationsmedium. Danach wurden je 2 Wells pro 6-Well-Platte mit 20 μ L humanen IL-4 (Stockkonzentration 2 ng/ μ L) bzw. einer Kombination aus 10 μ L LPS (Stockkonzentration 10 ng/ μ L) und 20 μ L human IFN γ (Stockkonzentration 2 ng/ μ L) behandelt. Die beiden

6-Well-Platten wurden anschließend für sechs Stunden und 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ weiter kultiviert. Nach der Polarisation wurde von jeder Versuchsbedingung RNA isoliert (siehe peqGOLD Total RNA Kit, 2.2.2 a), eine cDNA-Synthese (siehe Omniscript, 2.2.2 c) durchgeführt und die Expression bezüglich der M1-Marker (CXCL9, CXCL10, CCL2) und der M2-Marker (CCL22, CCL18, CCL13, CCL17 und Mannose-Rezeptor) mittels real-time PCR (siehe 2.2.2 e1) überprüft.

b) von THP1- und BlaER1-Zellen

Von einer THP1- oder BlaER1-Zellsuspension mit einer Dichte von ca. 70% - 80% wurde ein Aliquot zur Zellzahlbestimmung abgenommen. 400000 THP1-Zellen pro Well wurden in je 2 mL RPMI-Medium aufgenommen und in eine 6-Well-Platte ausgesät. Anschließend wurden fünf Wells der 6-Well-Platte mit je 2 μ L PMA (Stockkonzentration 10 ng/ μ L) behandelt. Die Zellen im 6. Well dienten als unbehandelte Kontrolle. Die 6-Well-Platte wurde für weitere drei Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach drei Tagen PMA-Behandlung wurde ein Mediumwechsel mit 1% FCS durchgeführt. Anschließend wurden vier Wells mit M1 und M2 Induktoren behandelt. Je ein Well wurde mit 20 μ L human IL-4 (Stockkonzentration 2 ng/ μ L), 10 μ L LPS (Stockkonzentration 10 ng/ μ L), 20 μ L human IFN γ (Stockkonzentration 2 ng/ μ L) oder einer Kombination von LPS und IFN γ behandelt. Die

6-Well-Platte wurde anschließend für sechs Stunden bei 37°C und 5% CO₂ weiter kultiviert. Nach der Polarisation wurde von jeder Versuchsbedingung RNA isoliert (peqGOLD Total RNA Kit, 2.2.2 a), eine cDNA-Synthese (Omniscript, 2.2.2 c) durchgeführt und die Expression bezüglich der M1-Marker (CXCL9, CXCL10, CCL2) und der M2-Marker (CCL18, CCL13, CCL17 und Mannose-Rezeptor) mittels real-time PCR überprüft (Punkt 2.2.2 e1).

Bei den BlaER1-Zellen wurden 1×10^6 Zellen in je drei mL RPMI aufgenommen und in eine 6-Well-Platte ausgesät. Da die BlaER1-Zellen zunächst in Makrophagen transdifferenziert werden mussten, wurde zu jedem Well je 3 μ L human IL-3 (Stockkonzentration 10 ng/ μ L), 3 μ L M-CSF (Stockkonzentration 10 ng/ μ L) und 3 μ L β -Estradiol (Stockkonzentration 100 nM) hinzugegeben. Am 2. und am 5. Tag nach Aussaat der Zellen wurden 50% des Mediums gewechselt. Am 7. Tag wurden die Zellen wie bereits oben beschrieben für sechs Stunden in M1 und M2 Richtung polarisiert. Da die Zellen nach der Transdifferenzierung nur semi-adhärenz wurden, wurde das Medium mit einer Kolbenhubpipette vorsichtig abgenommen und 2 mL frisches RPMI Medium mit 1% FCS in jedes Well gegeben. Anschließend wurden je 2 Wells mit 20 μ L humanen IL-4 (Stockkonzentration 2 ng/ μ L) bzw. mit einer Kombination aus 10 μ L LPS (Stockkonzentration 10 ng/ μ L) und 20 μ L human IFN γ (Stockkonzentration 2 ng/ μ L) für sechs Stunden behandelt. Nach der Polarisation wurde von jeder Versuchsbedingung wie oben beschrieben die Expression bezüglich der bereits genannten M1-Marker und M2-Marker mittels real-time PCR (Punkt 2.2.2 e1) überprüft. In Abbildung 1 ist die Durchführung des Experiments schematisch am Beispiel von THP1-Zellen dargestellt.

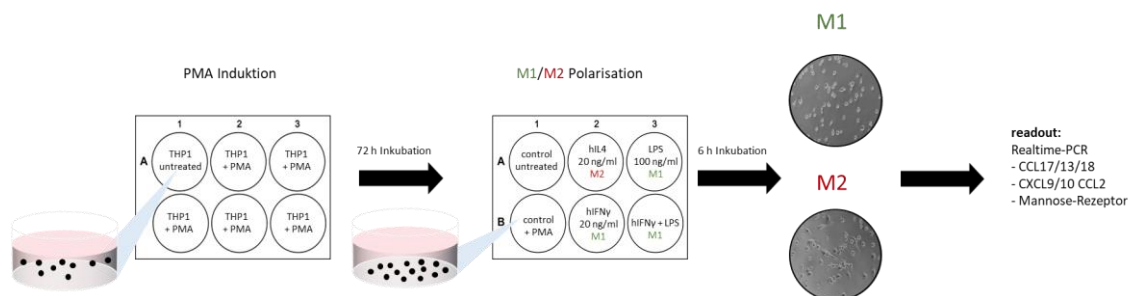


Abbildung 1: M1/M2 Polarisation am Beispiel der THP1-Zellen

In der Abbildung 1 ist schematisch die Durchführung des Experiments am Beispiel der THP1-Zellen dargestellt.

2.2.5 Ko-Kultur Experimente

a) Ko-Kultur mit polarisierten THP1-/BlaER1-Zellen und Pankreaskarzinom-Zelllinien

Die Ko-Kultivierung (transwell-Assays) von Makrophagen und Pankreaskarzinom-Zelllinien erfolgte mit THP1-Zellen oder BlaER1-Zellen sowohl im 12-Well als auch im 6-Well Format. Dabei erfolgte die Polarisation der beiden Makrophagen-Zelllinien wie unter 2.2.5 b) beschrieben. Einziger Unterschied bestand darin, dass die PMA-Behandlung der THP1-Zellen 48 Stunden dauerte. In der Abbildung 2.2 ist die Durchführung des Ko-Kulturversuchs schematisch am Beispiel mit THP1- und S2-007-Zellen dargestellt. Für die Ko-Kulturen der THP1-Zellen im

12-Well Format wurden je 500 μ L RPMI mit 10% FCS in je sechs Wells vorgelegt, sechs

12-Well-Insert mit einer Pinzette in die Wells gesetzt und je Insert 200000 THP1 + PMA in 500 μ L RPMI mit 10% FCS ausgesät. Bei den Ko-Kulturen mit BlaER1-Zellen wurden zunächst 1,5 mL RPMI + 10% FCS mit hIL-3, M-CSF und β -Estradiol in sechs 6-Wells vorgelegt und anschließend 800000 BlaER1-Zellen in 1,5 mL RPMI + 10% FCS mit IL-3, M-CSF und β -Estradiol je sechs 6-Well-Insert ausgesät. Ein Tag vor der Polarisation der Makrophagen wurden die Pankreaskarzinom-Zelllinien in dem entsprechenden RPMI-Medium mit FCS in neue sechs 12- bzw. 6-Wells ausgesät und für ca. 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ weiter kultiviert (siehe Tabelle 22).

Tabelle 22: Kulturbedingungen von Zellen im 12- und 6-Well Platten

Die Tabelle 22 zeigt die Zellzahlen der jeweiligen Zelllinien für 12-Well, 6-Well und 12Well-/6-Well-Insert.

Pankreaskarzinom-Zelllinien	Zellzahl / 12-Well	Zellzahl/ 6-Well	Zellzahl/ 12-Well-Insert	Zellzahl/ 6-Well-Insert
S2-007	20000	40000		200000
PaTu 8988t	15000	50000		
LON 556	60000	80000		
LON 560		70000		
THP1			200000	400000
BlaER1		1*10 ⁶	250000	800000

Nach sechs Stunden Polarisation wurde das Medium in den Inserts durch RPMI + 1% FCS ersetzt. Auch bei den Pankreaskarzinom-Zelllinien erfolgte ein Mediumwechsel mit RPMI + 1% FCS. Anschließend wurden je drei Inserts in die Wells zu den Pankreaskarzinom-Zelllinien gesetzt und für 72 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ weiter

kultiviert. Als Kontrollen wurden je drei Inserts stimuliert mit PMA/transdifferenziert, mit IL-4 oder mit LPS/IFN γ wie auch Pankreaskarzinom-Zelllinien für 72 Stunden weiter kultiviert, die nicht in Ko-Kultur gesetzt wurden.

Nach der Ko-Kultur wurde die RNA der Makrophagen isoliert (peqGOLD Total RNA Kit, 2.2.2 a), eine cDNA-Synthese (Omniscript, 2.2.2 c) durchgeführt und die Expression bezüglich der M1-Marker (CXCL9, CXCL10 und CCL2) und der M2-Marker (CCL18, CCL13, CCL17 und Mannose-Rezeptor) mittels real-time PCR (Punkt 2.2.2 e1) überprüft. Mit den Pankreaskarzinom-Zelllinien wurde ein Viabilitätstest (MTT Assay) durchgeführt.

MTT Viabilitäts-Assay

Nach dem Ko-Kultur Experiment wurde das Medium der Pankreaskarzinom-Zelllinien gewechselt und durch RPMI + 1% FCS mit 0,2 mg/mL Thiazolylblau ersetzt. Die Zellen wurden anschließend für weitere 90 Minuten mit dem Farbstoff inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium abgekippt und die Zellen mit einer Solubilisierungslösung lysiert und so der Farbstoff aus den Zellen herausgelöst. Anschließend erfolgte die Absorptionsmessung in einem Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 570 nm. Die Intensität der gemessenen Absorption korrelierte dabei mit der Zellviabilität. Der Aufbau des Versuches ist beispielhaft in Abbildung 2 dargestellt.

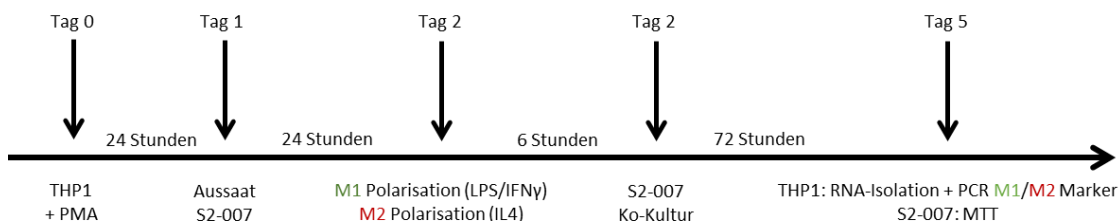


Abbildung 2: Ko-Kultur mit THP1-Zellen und Pankreaskarzinom-Zelllinien

In Abbildung 2 ist schematisch die Durchführung des Ko-Kulturversuchs am Beispiel mit THP1- und S2-007-Zellen dargestellt.

b) Kultivierung von Pankreaskarzinom-Zelllinien mit konditioniertem M1/M2 THP1 oder BlaER1 Medium

Bei der Behandlung von Pankreaskarzinom-Zelllinien mit konditioniertem Makrophagenmedium wurde zunächst wie bei 2.2.4 b) vorgegangen. Die Makrophagen wurden zunächst in sechs 6-Well ausgesetzt (1 x 10⁶ Zellen/Well für Blaer1-Zellen und 400000 Zellen/Well für THP1-Zellen) und für sechs Stunden in Richtung M1 und M2

polarisiert. Am Tag vor der Polarisation wurden entsprechend Pankreaskarzinom-Zelllinien in vier 6-Well ausgesetzt (siehe Tabelle 2.22) und für 24 Stunden weiter kultiviert. Nach der Polarisation wurde das Medium von den Makrophagen abgenommen, frisches RPMI-Medium mit 1% FCS hinzugefügt und die Makrophagen für weitere 24 Stunden kultiviert. Am nächsten Tag wurde von den Pankreaskarzinom-Zelllinien das Medium abgesaugt und 1 mL frisches RPMI Medium mit 1% FCS auf die Zellen gegeben. Nur die unbehandelten Kontrollen erhielten 2 mL frisches RPMI Medium mit 1% FCS. Anschließend wurde von den Makrophagen-Kulturen je Behandlung das konditionierte Medium gesammelt und je 1 mL des konditionierten Medium in je drei Wells der Pankreaskarzinom-Zelllinien pipettiert, sodass ein Verhältnis von 50% RPMI + 1% FCS und 50% konditionierten Makrophagen Medium hergestellt wurde. Die Zellen wurden danach für 72 Stunden weiter kultiviert. Nach den drei Tagen wurde mit den Pankreaskarzinom-Zelllinien ein Viabilitätstest (MTT Assay) durchgeführt (siehe 2.2.5 a).

c) Kultivierung von M1/M2 THP1-Zellen mit konditioniertem Pankreaskarzinom-Zelllinienmedium

Bei der Behandlung von M1/M2 THP1-Zellen mit konditioniertem Pankreaskarzinom-Zelllinienmedium ging man zunächst wie bei 2.2.4 b) vor. Die THP1-Zellen wurden zunächst in je 12 12-Well-Inserts ausgesetzt (200000 Zellen/Well THP1-Zellen) und nach der PMA-Induktion für sechs Stunden in Richtung M1 und M2 polarisiert. Am selben Tag wurden entsprechend Pankreaskarzinom-Zelllinien in je 2 Wells einer 6-Well-Platte ausgesetzt (siehe Tabelle 2.22) und für die Dauer der PMA-Induktion und der Polarisation kultiviert. Nach der Polarisation wurde von den Makrophagen das Medium abgenommen und 0,5 mL frisches RPMI-Medium mit 1% FCS hinzugefügt. Nur die unbehandelten Kontrollen erhielten 1 mL frisches RPMI Medium mit 1% FCS. Anschließend wurde je 0,5 mL konditioniertes Medium der Tumorzelllinien in je ein Well der polarisierten THP1-Zellen pipettiert, sodass ein Verhältnis von 50% RPMI + 1% FCS und 50% konditionierten Tumorzell-Medium hergestellt wurde. Die Zellen wurden danach für 24 Stunden weiter kultiviert. Abschließend wurden von den THP1-Zellen RNA isoliert (peqGOLD Total RNA Kit, 2.2.2 a), eine cDNA-Synthese (Omniscript, 2.2.2.c) durchgeführt und die Expression bezüglich M1-Marker (CXCL9 und CXCL10) und M2-Marker (CCL13 und Mannose-Rezeptor) mittels real-time PCR (Punkt 2.2.2 e1) überprüft.

2.2.6 Validierung und Isolierung extrazellulärer Vesikel von Tumorzellen und polarisierten Makrophagen

Isolation extrazellulärer Vesikel

Die Isolation von extrazellulären Vesikeln erfolgte mittels Ultrazentrifugation (siehe Abbildung 3). Dafür wurden Tumorzellen in je acht T175 Flaschen und Makrophagen (THP1 und BlaER1) in je 12 6-Wells und 12 6-Well-Inserts ausgesät. Wenn die Tumorzellen eine Konfluenz von etwa 80% erreicht hatten, wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und anschließend je 12 mL RPMI Medium ohne FCS zu den Zellen gegeben. Bei den Makrophagen wurde nach der Polarisation zum M2-Typ (Punkt 2.2.4 b)) die Zellen einmal mit PBS gewaschen und je 1 mL RPMI Medium ohne FCS in das Well und in das Insert gegeben. Nach dem Mediumwechsel wurden die Inserts zu den anderen Makrophagen bzw. Tumorzellen gesetzt und für weitere 48 Stunden kultiviert. Nach zwei Tagen wurde das Medium von den Zellen gesammelt und es folgten serielle Zentrifugationsschritte bis zur Isolation der extrazellulären Vesikel. Um Zellen und Zellfragmente abzutrennen, wurde der Zellüberstand zuerst für zehn Minuten bei 350 x g zentrifugiert. Anschließend wurden tote Zellen durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 1000 x g pelletiert. Zuletzt wurden apoptotische Zellen und große Mikropartikel durch eine Zentrifugation für eine Stunde bei 10000 x g aus dem Zellüberstand entfernt. Danach wurde das Medium auf Ultrazentrifugationsröhrchen zu je 23 mL aufgeteilt. Nun erfolgte die Isolation der extrazellulären Vesikel für 90 Minuten bei 100000 x g in einer Ultrazentrifuge. Der Überstand mit freien Proteinbestandteilen und miRNAs wurde verworfen, die pelletierten Vesikel in einem Röhrchen gesammelt, die Vesikel in 23 mL HBSS gewaschen und der Ultrazentrifugationsschritt wiederholt. Die pelletierten Vesikel wurden je nach nachfolgendem Experiment in dem dafür entsprechenden Puffer resuspendiert (siehe Tabelle 23). Wenn die Vesikel nicht am selben Tag verarbeitet wurden, wurden diese bis zur weiteren Verwendung bei -20°C bis -80°C gelagert.

Tabelle 23: Puffersysteme für das Lösen von Vesikelpellets je nach angewandter Methode

In der Tabelle 23 sind die entsprechenden Mengen an Puffer je nach nachfolgender Analyse­methode für die Vesikel aufgelistet.

	Methode	Puffer in [µL]
Extrazelluläre Vesikel	Protein-Isolation für Western Blot	100 µL RIPA Puffer
	RNA-Isolation	100 µL cell disruption Puffer
	NTA-Messung und/oder Zellbehandlung mit Vesikeln	150 µL HBSS
	Elektronmikroskopie	50 µL 4% PFA Lösung

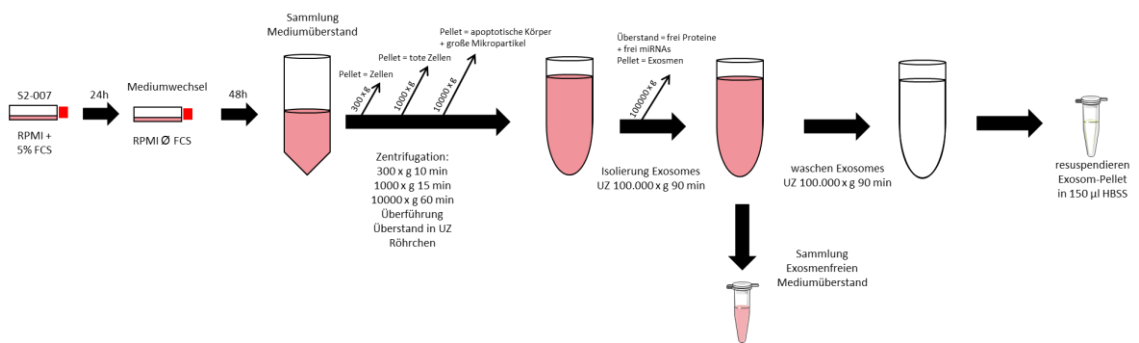


Abbildung 3: Isolation von extrazellulären Vesikeln

In Abbildung 3 ist schematisch die Isolation von extrazellulären Vesikeln mittels Ultrazentrifugation dargestellt.

Elektronmikroskopie

Die Aufnahmen der extrazellulären Vesikel mittels Elektronmikroskopie wurden in Kooperation mit der Abteilung Neuropathologie, unter der Leitung von Prof. Dr. A. Pagenstecher, durchgeführt.

Die Vesikel wurden wie unter der Punkt 2.2.7 beschrieben isoliert, in 50 µL 4% PFA aufgenommen und mit einer Kanüle (26 G, 0,45x 25 mm) gründlich vereinzelt. Die anschließende Präparation der Proben für die Elektronenmikroskopie folgte dem Protokoll nach Théry et al., 2006, support Protocol 4 und wurde von einer technischen Assistentin aus der Arbeitsgruppe durchgeführt (Théry et al. 2006). Die elektronenmikroskopische Aufnahme der Vesikel wurden von Prof. Dr. A. Pagenstecher bei 80 kV mit dem Elektronenmikroskop Zeiss EM902 durchgeführt.

Nanopartikel Tracking Analyse (NTA)

Die Messung der Partikelkonzentration/mL und Größe der Vesikel erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Pogge von Strandmann und dem Nano Particle Tracking Analyser (ZetaView®). Zur Justierung der Optik des Gerätes und der Funktionsüberprüfung wurde zu Beginn jeder Messung ein 99 nm Referenzstandard mit der Konzentration $2,1 \times 10^7$ Partikel/mL vermessen. Das Messprinzip beruht auf der Bestimmung der Brownschen Bewegung jedes erfassten Partikels in einer Videosequenz. Die Partikel werden mit Hilfe eines Laserstrahls visualisiert. Das dadurch auftretende Streulicht von den Partikeln wird von einer lichtempfindlichen Kamera, welche im 90° Winkel zum Laserstrahl angebracht ist, detektiert. Das ebenso in 90° angebrachte Ultramikroskop erlaubt die Detektion und Verfolgung der unterschiedlichen Diffusionbewegung der Partikel zwischen 10 und 1000 nm in der Flüssigkeit. An Hand eines speziellen Algorithmus kann so der hydrodynamische Durchmesser jedes erfassten Partikels berechnet werden. Innerhalb der Messzelle erfolgte die Bestimmung einer Probe an 11 unterschiedlichen Positionen. Auf dieser Grundlage erfolgt einerseits eine Aussage über die Streuung der Größe der Partikel und andererseits über die Konzentration der Partikel/mL in der Probe. Nach der Vermessung des Referenzstandards erfolgte die Messung der isolierten Exosomen aus Tumorzellen bzw. Makrophagen. Um ungefähr die für das Gerät optimale Messkonzentration von $2,1 \times 10^7$ Partikel/mL zu erreichen wurden die Proben in einer Verdünnung von 1:100 bis 1:2000 vermessen. Je 1 mL Probe wurde mit einer Spritze auf die Messezelle gegeben. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnungsstufe erhielt man eine PDF-Datei mit der entsprechenden Partikelkonzentration/mL und Größe der Vesikel und eine Videosequenz. Zum Vergleich der erhaltenen Partikelkonzentration wurde immer die Anzahl der Zellen bestimmt von denen die extrazellulären Vesikel isoliert wurden.

2.2.7 Transfektion von S2-007-Zellen mit siRNA IGFII

Für die Transfektion wurden 60000 S2-007-Zellen in je 48 Wells von je acht 6-Well-Platten gesät und im Brutschrank kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit RNAi Max und siRNA gegen IGFII transfiziert (Transfektionsschema siehe Tabelle 24).

Tabelle 24: Transfektionsschema siRNA IGFII

In der Tabelle 24 ist das Transfektionsschema im 4-fachen Ansatz für jeweils eine siRNA gegen IGFII und die siRNA-Kontrolle dargestellt.

S2-007Zellen + 20 nM siRNA		S2-007Zellen + 20 nM siRNA-Kontrolle	
RNAi Max	siRNA IGFII	RNAi Max	siRNA-Kontrolle
8 µL + 600 µL RPMI Ø FCS	9,2 µL + 600 µL RPMI Ø FCS	8 µL + 600 µL RPMI Ø FCS	9,2 µL + 600 µL RPMI Ø FCS
5 min Inkubation	5 min Inkubation	5 min Inkubation	5 min Inkubation
+		+	
20 min Inkubation		20 min Inkubation	

Für den Transfektionsansatz wurden RNAi Max und siRNA einzeln in RPMI-Medium ohne FCS gegeben und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die beiden Komponenten zusammen pipettiert und vorsichtig mit der Pipette gemischt und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden je 300 µL Transfektionsansatz zu den Tumorzellen pipettiert, was einer Endkonzentration von 20 nM siRNA im Medium entsprach.

2.2.8 Transfektion von polarisierten THP1-Zellen mit miRNA-Inhibitoren

Nach der M2 Polarisation der THP1-Zellen wurde das Medium mit RPMI + 1% FCS gewechselt und je 4 Inserts mit je 300 µL Transfektionsansatz für die miRNA-Inhibitoren 6724, 4497, 5787 und die miRNA-Inhibitor-Kontrolle für 24 Stunden behandelt (siehe Tabelle 25). Die Endkonzentration im Medium betrug hier 60 nM für die miRNA-Inhibitoren und die Negativkontrolle.

Tabelle 25: Transfektionsschema für miRNA-Inhibitoren

In der Tabelle 25 ist das Transfektionsschema für im 4-fachem Ansatz für jeweils ein miRNA Inhibitor und die miRNA Kontrolle dargestellt.

THP1-Zellen + 60 nM miRNA Inhibitor		THP1-Zellen + 60 nM miRNA-Negativkontrolle	
RNAi Max	miRNA-Inhibitor	RNAi Max	miRNA-Negativkontrolle
8 µL + 600 µL RPMI Ø FCS	9,2 µL + 600 µL RPMI Ø FCS	8 µL + 600 µL RPMI Ø FCS	9,2 µL + 600 µL RPMI Ø FCS
5 min Inkubation	5 min Inkubation	5 min Inkubation	5 min Inkubation
+		+	
20 min Inkubation		20 min Inkubation	

2.2.9 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5. Für die Gruppenvergleiche wurden der arithmetische Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (stabw.) berechnet. Zur statistischen Auswertung wurde je eine Versuchsgruppe in Bezug auf die Kontrollgruppen mit einem ungepaarten zweiseitigen t-Test analysiert. Signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden durch Sternchen (*) gekennzeichnet. Das Signifikanzniveau lag dabei bei einem p-Wert $< 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung Markersystem für die Polarisation humaner primärer Monozyten zum M1/M2 Typ

Zur Vorbereitung von Ko-Kulturversuchen mit M1 bzw. M2 Makrophagen und Tumorzellen, musste zunächst die gezielte Makrophagen-Differenzierung und –Polarisierung etabliert werden.

Zuerst wurde die Makrophagendifferenzierung im primären humanen System validiert. Über eine bestehende Kooperation mit dem Transfusionszentrum des Universitäts-Klinikums Gießen-Marburg, Standort Gießen, wurden buffy coats aus Spenderblut bezogen. Hierbei konnte auf ein bereits etabliertes Protokoll zur Isolation der PBMCs, der anschließenden Isolation der Monozyten und der Differenzierung und Polarisation zu Makrophagen zurückgegriffen werden. Die Polarisation der Monozyten wurde explorativ aus zwei buffy coats für den Zeitraum von 6 Stunden und 24 Stunden getestet. Danach wurden die polarisierten Makrophagen analysiert und basierend auf den in der Literatur bereits beschriebenen M1 und M2-Markern, folgende Marker in der real-time PCR quantifiziert: M1-Marker (CXCL9, CXCL10, CCL2) und M2-Marker (CCL22, CCL18, CCL13, CCL17 und Mannose-Rezeptor) (Mantovani et al. 2004).

Sowohl nach 6 Stunden als auch nach 24 Stunden Polarisation zeigte sich eine eindeutige Unterscheidung zwischen dem M1 und M2 Makrophagen-Phänotyp (Abbildung 4 und 5). Die Stimulation mit LPS/IFN γ zum M1-Phänotyp zeigte eine Überexpression der Marker CXCL9 (Abbildung 4 D) und CXCL10 (Abbildung 4 E) nach 6 Stunden. Dieses Ergebnis konnte auch nach 24 Stunden Stimulation gezeigt werden (Abbildung 5 F und G). Zusätzlich zu den Markern CXCL9 und CXCL10 wurde hier noch der Marker CCL2 getestet. Dieser zeigte zwar keine Überexpression in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle aber eine deutlich stärkere Expression im Vergleich zu den IL-4 behandelten Zellen (Abbildung 5 H). Im Gegensatz dazu führte eine Stimulation mit IL-4 zum M2-Phänotyp, nach 6 Stunden Inkubation im Vergleich zur Kontrolle zu einer Überexpression der Marker CCL13, CCL17 und des Mannose-Rezeptors, während diese Marker eine sehr niedrige Expression in den LPS/IFN γ behandelten Zellen aufwiesen (Abbildung 4 A, B und C). Auch nach 24 Stunden Stimulation zeigte sich ein ähnliches Ergebnis (Abbildung 5 A, B und C). Hier wurden zusätzlich die Marker CCL22 und CCL18 getestet. Auch der CCL18-Marker zeigte eine

deutliche Überexpression im Vergleich zur Kontrolle, während dessen Expression in den LPS/IFN γ behandelten Zellen deutlich niedriger ausfiel (Abbildung 5 D). Der CCL22-Marker erschien jedoch nicht als M2-Marker geeignet, da hier kein Unterschied in der Expression zwischen IL-4 und LPS/IFN γ behandelten Zellen erkennbar war (Abbildung 5 E).

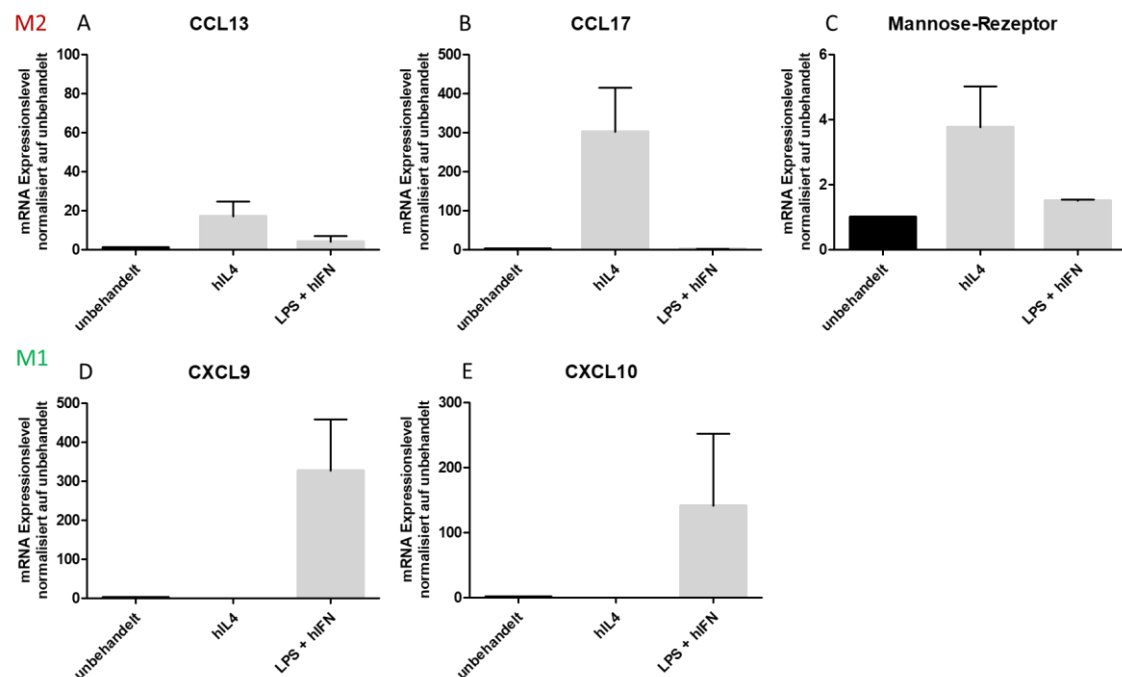


Abbildung 4: Die Polarisation von primären Monozyten aus buffy coats führte nach 6 Stunden Stimulation zu M1/M2 spezifischen mRNA-Expressionen

Humane primäre Monozyten wurden aus buffy coats isoliert und für 6 Stunden mit LPS/IFN γ zu M1- bzw. mit IL-4 zu M2 Makrophagen polarisiert. Anschließend wurde eine qRT-PCR-Analyse durchgeführt und die auf die unbehandelte Probe normalisierten mRNA-Expressionslevel der M1- und M2-Marker dargestellt. M2-Marker (A) CCL13, (B) CCL17, (C) Mannose-Rezeptor.

M1-Marker (D) CXCL9, (E) CXCL10. Es wurden die Mittelwerte \pm Stabw. (n=2) dargestellt.

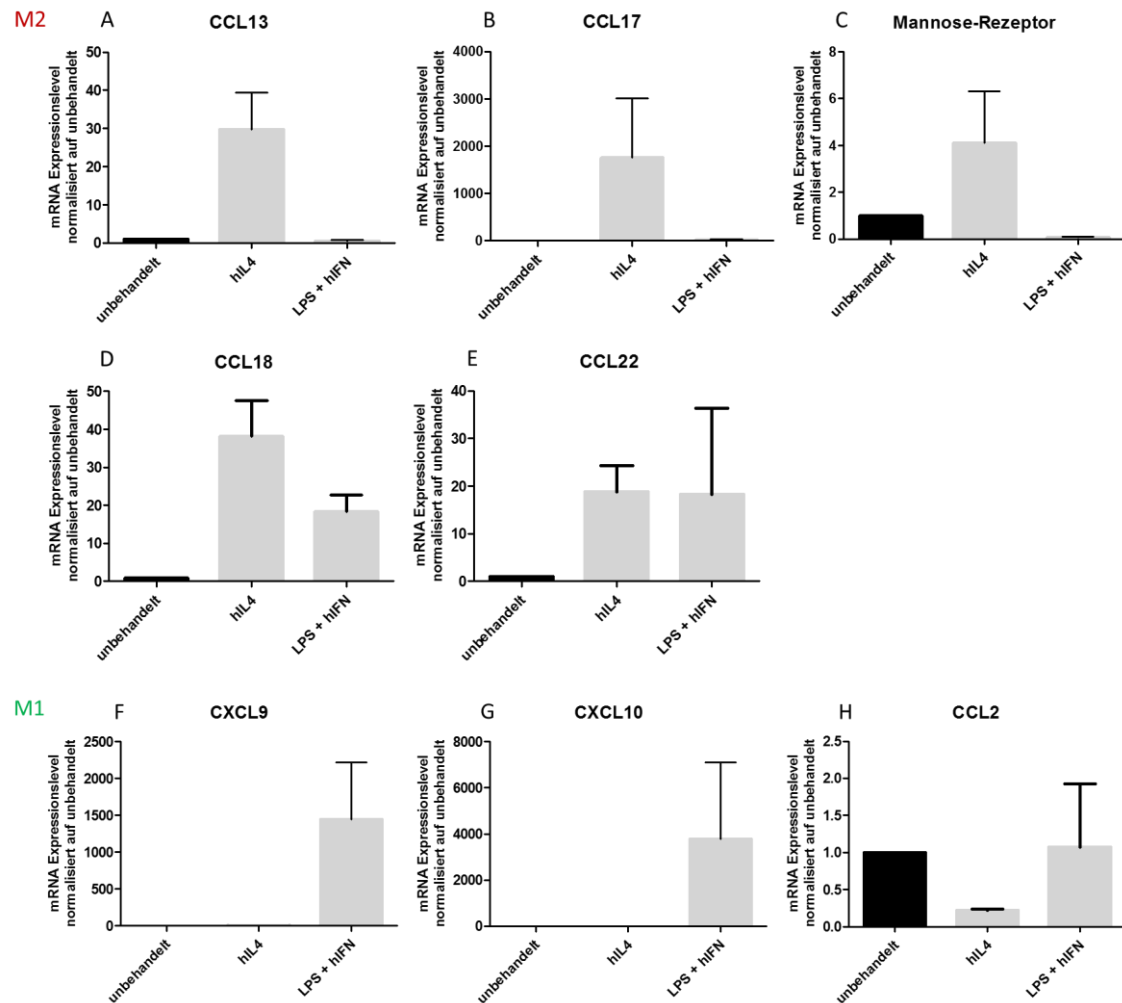


Abbildung 5: Die Polarisation von primären Monozyten aus buffy coats führte nach 24 Stunden Stimulation zu M1/M2 spezifischen mRNA-Expressionen

Humane primäre Monozyten wurden aus buffy coats isoliert und für 24 Stunden mit LPS/IFN γ zu M1- bzw. mit IL-4 zu M2 Makrophagen polarisiert. Anschließend wurde eine qRT-PCR-Analyse durchgeführt und die auf die unbehandelte Probe normalisierten mRNA-Expressionslevel der M1- und M2-Marker dargestellt. M2-Marker (A) CCL13, (B) CCL17, (C) Mannose-Rezeptor, (D) CCL18, (E) CCL22. M1-Marker (F) CXCL9, (G) CXCL10, (H) CCL2. Es wurden die Mittelwerte \pm Stabw. (n=2)

3.2 Humane THP1- und BlaER1-Zellen lassen sich zum M1/M2 Typ polarisieren

Basierend auf den ersten Polarisations-Ergebnissen der buffy coats wurde die Polarisation in den Zelllinien THP1 und BlaER1 in einem Zeitraum von 6 Stunden getestet und wie oben eine real-time PCR-Analyse der M1- und M2-Marker durchgeführt.

Wie bereits bei den buffy coats war auch in den Zelllinien THP1 und BlaER1 nach 6 Stunden Polarisation eine sichere Unterscheidung zwischen dem M1 und dem M2 Makrophagen-Phänotyp möglich (Abbildung 6 und 7). Die Stimulation mit LPS, IFN γ

und LPS/IFN γ zum M1-Phänotyp zeigte bei den THP1-Zellen eine deutliche Überexpression der Marker CXCL9, CXCL10 und CCL2 in den LPS/IFN γ behandelten Zellen, während die Expression dieser Marker in den LPS oder IFN γ mono-behandelten Zellen deutlich niedriger im Vergleich zu den LPS/IFN γ behandelten Zellen war (Abbildung 6 E, F und G). Dabei wies nur der CXCL10 Marker einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen unbehandelten und LPS/IFN γ behandelten THP1-Zellen auf (Abbildung 6 F).

Auch bei den mit LPS/IFN γ behandelten BlaER1-Zellen waren die M1-Marker CXCL9, CXCL10 und CCL2 im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle deutlich überexprimiert (Abbildung 7 E, F und G). Die M2-Phänotyp-Stimulation mit IL-4 führte bei den THP1-Zellen nach 6 Stunden Polarisation zu einer Überexpression der Marker CCL13, CCL17 und des Mannose-Rezeptors im Vergleich zur Kontrolle, während diese Marker gleichzeitig eine sehr niedrige Expression in den LPS/IFN γ behandelten Zellen aufwiesen (Abbildung 6 A, B und D). Der CCL18 Marker erschien dagegen für die THP1-Zellen nicht als M2-Marker geeignet, da dieser im Vergleich zur Kontrolle eine Überexpression in den LPS/IFN γ behandelten Zellen zeigte (Abbildung 6 C). Im Gegensatz zu den THP1-Zellen war bei den BlaER1-Zellen nach 6 Stunden Stimulation mit IL-4 ein deutlicher Anstieg der M2-Marker CCL13, CCL17, CCL18 und des Mannose-Rezeptors zu beobachten. Die Expression dieser Marker fiel wie bei den THP1-Zellen auch in den LPS/IFN γ behandelten Zellen deutlich niedriger aus (Abbildung 7 A, B, C und D). Auf Grund der hohen Varianzen innerhalb der Werte zwischen den einzelnen Versuchen, konnte mit Hilfe des t-Testes nur vereinzelt signifikante Unterschiede detektiert werden. Dennoch ist die Richtung der überexprimierten M1/M2-Marker nach entsprechendem Stimulus deutlich sowohl in den THP1- als auch in den BlaER1-Zellen erkennbar. Nach diesem Versuch wurde für zukünftige Experimente standardmäßig eine Polarisationszeit von 6 Stunden für THP1- und BlaER1-Zellen festgelegt.

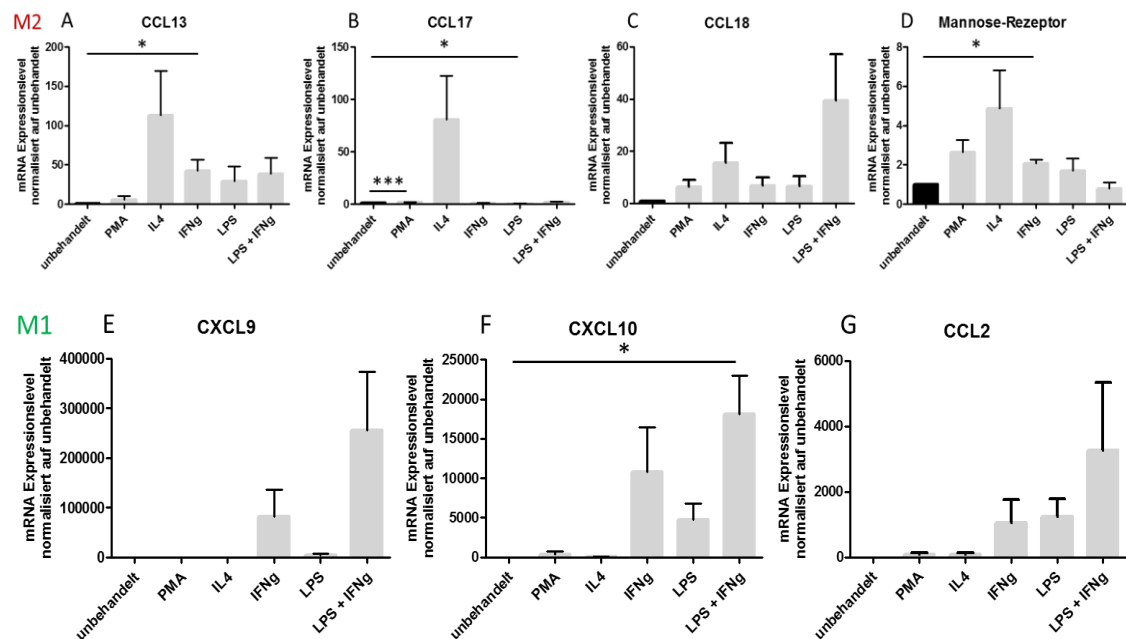


Abbildung 6: Die Polarisation von THP1-Zellen führte nach 6 Stunden Stimulation zu

M1/M2 spezifischen mRNA-Expressionen

THP1-Zellen wurden für 6 Stunden mit LPS, IFN γ und LPS/IFN γ zu M1- bzw. mit IL-4 zu M2 Makrophagen polarisiert. Anschließend wurde eine qRT-PCR-Analyse durchgeführt und die auf die unbehandelte Probe normalisierten mRNA-Expressionslevel der M1- und M2-Marker dargestellt. M2-Marker (A) CCL13, (B) CCL17, (C) CCL18 (D) Mannose-Rezeptor.

M1-Marker (E) CXCL9, (F) CXCL10 (G) CCL2. Es wurden die Mittelwerte \pm Stabw. (n=3) dargestellt. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt, beidem die grau gekennzeichneten Versuchsgruppen mit der jeweiligen schwarzen Kontrollgruppe verglichen wurde. Nur signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet.

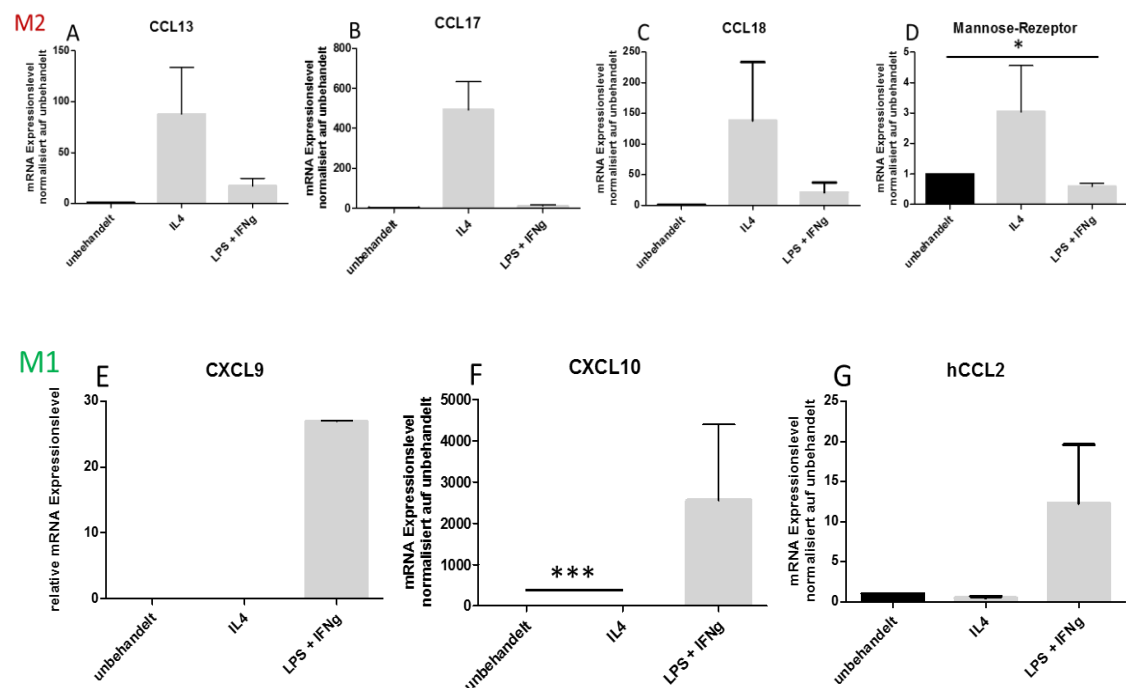


Abbildung 7: Die Polarisation von BlaER1-Zellen führte nach 6 Stunden Stimulation zu

M1/M2 spezifischen mRNA-Expressionen

BlaER1-Zellen wurden für 6 Stunden mit LPS/IFN γ zu M1- bzw. mit IL-4 zu M2 Makrophagen polarisiert. Anschließend wurde eine qRT-PCR-Analyse durchgeführt und die auf die unbehandelte Probe normalisierten mRNA-Expressionslevel der M1- und M2-Marker dargestellt. M2-Marker (A) CCL13, (B) CCL17, (C) CCL18 (D) Mannose-Rezeptor.

M1-Marker (E) CXCL9 relative mRNA-Expression zum Haushaltsgen RPLP0, (F) CXCL10 (G) CCL2. Es wurden die Mittelwerte \pm Stabw. (n=3) dargestellt. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt, bei dem die grau gekennzeichneten Versuchsgruppen mit der jeweiligen schwarzen Kontrollgruppe verglichen wurden. Nur signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet.

3.3 Der Einfluss von Makrophagen auf Tumorzellen und von Tumorzellen auf Makrophagen unter Ko-Kulturbedingungen

Nachdem die Polarisation von THP1- und BlaER1-Zellen in die funktionellen Phänotypen M1 und M2 erfolgreich etabliert werden konnte, wurden als nächstes Ko-Kulturversuche (transwell-Assays, siehe Punkt 2.2.5 a)) mit polarisierten THP1-/BlaER1-Zellen und Pankreaskarzinom-Zelllinien durchgeführt. Hier sollte im speziellen untersucht werden, welchen Einfluss die Tumorzellen auf die polarisierten Makrophagen ausüben und ob die Makrophagen umgekehrt die Zellviabilität der Tumorzellen beeinflussen können. Dazu wurden zu M1 und M2 polarisierte Makrophagen über einen Zeitraum von drei Tagen mit Tumorzellen ko-kultiviert, wobei als Kontrolle Einzelkulturen von polarisierten Makrophagen und Tumorzellen mitgeführt wurden. Anschließend wurden auf Seiten der Makrophagen die Entwicklung der entsprechenden M1- und M2-Marker mittels real-time PCR analysiert, während auf der Seite der Tumorzellen die Zellviabilität via MTT gemessen wurde.

Der MTT Assay der S2-007-Zellen zeigte, dass in Anwesenheit von M1-polarisierten THP1-Zellen im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant verringerte Viabilität detektiert werden konnte. In Anwesenheit von PMA induzierten oder M2-polarisierten THP1 Makrophagen, zeigten S2-007-Zellen eine leichte Tendenz einer verbesserten Zellviabilität, die aber keine statistische Signifikanz erreichte (Abbildung 8 A).

Dagegen zeigten PaTu 8988t-Zellen unabhängig der Makrophagen-Polarisation kein signifikant erniedrigtes oder erhöhtes Zellwachstum im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 8 B).

LON 560-Zellen zeigten ähnlich wie die S2-007 Zellen in Anwesenheit von M1-polarisierten THP1-Zellen im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant verringerte Zellviabilität. Im Gegensatz zu den S2-007-Zellen zeigte sich jedoch auch in Anwesenheit von PMA induzierten oder M2-polarisierten THP1 Makrophagen, wenn auch nicht signifikant, eher eine Tendenz zur Wachstumsinhibition (Abbildung 8 C).

LON 556-Zellen schließlich zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle. Jedoch verhielten sich die LON 556-Zellen in Anwesenheit der Makrophagen ähnlich wie die S2-007-Zellen. So zeigten auch diese mit M1 Makrophagen eher eine Tendenz zur Wachstumsinhibition, während M2 Makrophagen zu einer leicht erhöhten Zellviabilität führten (Abbildung 8 D).

Ähnliche Ergebnisse waren auch bei den MTT Assays der ko-kultivierten S2-007-Zellen mit polarisierten BlaER1 Makrophagen zu erkennen. Auch hier wiesen die S2-007-Zellen ko-kultiviert mit M1-polarisierten BlaER1-Zellen ein signifikant erniedrigtes Wachstumsverhalten im Vergleich zur Kontrolle auf, während die anderen beiden Gruppen mit PMA oder M2-polarisierten THP1-Zellen zwar keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle zeigten, aber dennoch eine deutliche Tendenz einer verbesserten Zellviabilität aufwiesen (Abbildung 8 E).

PaTu 8988t-Zellen zeigten in Anwesenheit von BlaER1 Makrophagen eine geringgradig, aber signifikant niedrigere Zellviabilität, während die anderen beiden Gruppen ebenfalls tendenziell zu einer Wachstumsinhibition führten, die aber keine statistische Signifikanz erreichte (Abbildung 8 F). Die LON 556 Zellen verhielten sich in Anwesenheit mit BlaER1 Makrophagen sehr ähnlich wie unter Ko-Kultur mit THP1-Zellen. So zeigten diese ebenso wie die S2-007-Zellen ein signifikant verringertes Zellwachstum in Anwesenheit von M1 BlaER1 Makrophagen. Wenn auch nicht statistisch signifikant, bewirkten M2 BlaER1-Zellen eine leichte Verbesserung der Zellviabilität (Abbildung 8 G).

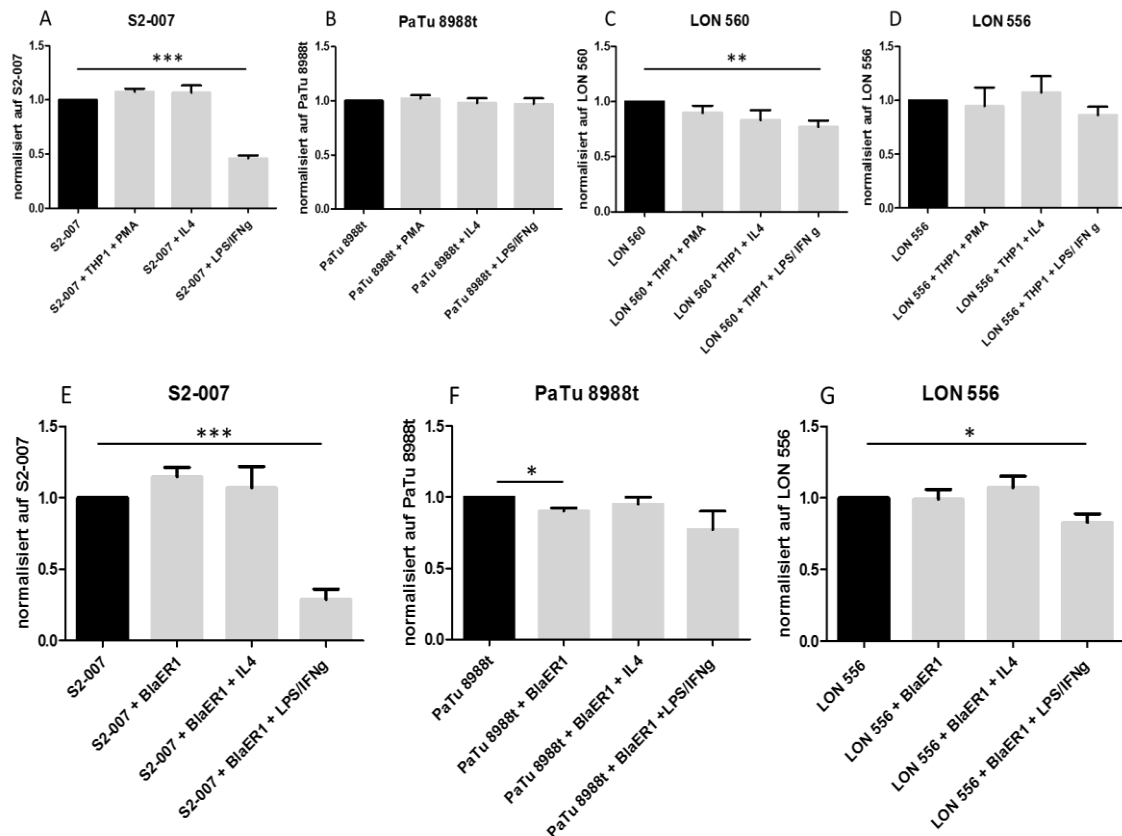


Abbildung 8: Einfluss polarisierter Makrophagen auf die Viabilität der Tumorzellen 72

Stunden nach Ko-Kultur

Die Zellviabilität der Tumorzelllinien wurde 72 Stunden nach Ko-Kultur mit polarisierten THP1-/BlaER1-Zellen mittels MTT-Assay überprüft und die gemessenen Werte normalisiert auf die jeweilige Kontroll-Tumorzelllinie dargestellt. Ko-Kultur mit polarisierten THP1-Zellen und (A) S2-007, (B) PaTu 8988t, (C) LON 556 und (D) LON 560. Es wurden die Mittelwerte \pm Stabw. (n=4) dargestellt.

Ko-Kultur mit polarisierten BlaER1-Zellen und (E) S2-007, (F) PaTu 8988t und (G) LON 556. Es wurden die Mittelwerte \pm Stabw. (n=5) dargestellt.

Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt, bei dem die grau gekennzeichneten Versuchsgruppen mit der jeweiligen schwarzen Kontrollgruppe verglichen wurden. Nur signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet.

Der Einfluss der Tumorzellen auf die Makrophagen wurde mittels real-time PCR analysiert. Es zeigte sich, dass die Expression der M1-Marker CXCL9 stark und CXCL10 sehr stark in LPS/IFN γ induzierten THP1-Zellen unter Ko-Kultur mit S2-007, PaTu 8988t und LON 556 im Verhältnis zur Kontrolle (polarisierte THP1-Zellen ohne Tumorzellen) abnahm, während der Polarisationsstatus der Kontrolle über den Zeitraum der Ko-Kultur aufrechterhalten werden konnte. Keiner der zu beobachtenden Tendenzen war dabei statistisch signifikant (Abbildungen 9, 10 und 11 (C und D)).

Die M2-Marker CCL13 und der Mannose-Rezeptor in den IL-4 induzierten THP1-Zellen unter Ko-Kultur mit S2-007 und PaTu 8988t wurden ebenfalls deutlich reduziert im Vergleich zur Kontrolle. Auch hier konnte der Polarisationsstatus der Kontrolle über

den Zeitraum der Ko-Kultur aufrechterhalten werden (Abbildung 9, 10 A und B). Die statistische Auswertung zeigte, dass die Reduktion des Mannose-Rezeptors als M2-Marker in ko-kultivierten PMA induzierten THP1-Zellen mit S2-007-Zellen im Vergleich zur Kontrolle als signifikant gewertet wurde (Abbildung 9 B). Die Reduktion des M2-Markers CCL13 unter Ko-Kulturbedingungen hingegen war nicht signifikant. (Abbildung 9 A). Ebenfalls formal signifikant war die Reduktion des M2-Markers CCL13 in ko-kultivierten PaTu 8988t Zellen mit IL-4 induzierten THP1-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 10 A), wobei die Reduktion des Mannose-Rezeptors unter Ko-Kultur nicht signifikant war (Abbildung 10 B). in IL-4 induzierten THP1-Zellen unter Ko-Kultivierung mit den Tumorzelllinien S2-007 und PaTu 8988t zeigte sich insgesamt eine deutlich stärkere Reduktion des M2-Markers CCL13 im Vergleich zur Kontrolle als beim Mannose-Rezeptor (Abbildungen 9 und 10 (A und B)).

Auch bei den ko-kultivierten IL-4 induzierten THP1-Zellen mit LON 556-Zellen konnte eine deutliche Reduktion des M2-Markers CCL13 im Vergleich zur Kontrolle vermerkt werden. Diese fiel jedoch im Vergleich zur Reduktion der M2-Marker unter Ko-Kultur mit S2-007 und PaTu 8988t deutlich schwächer aus. Eine zusätzliche Ausnahme bildet der M2-Marker Mannose-Rezeptor, welcher eine leichte Überexpression unter Ko-Kultur Bedingungen im Vergleich zur Kontrolle aufwies. Jedoch war keiner der beobachteten Tendenzen statistisch signifikant (Abbildung 11 A und B).

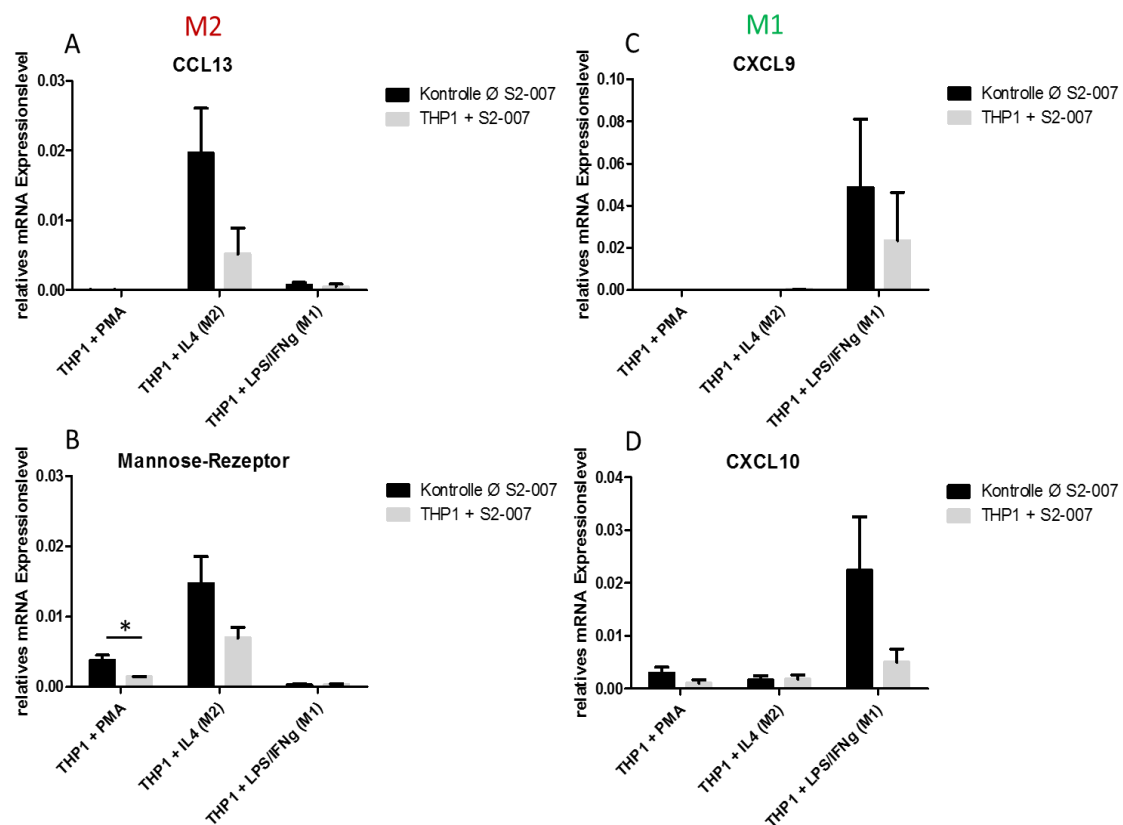


Abbildung 9: Einfluss von S2-007-Zellen auf die M1/M2 mRNA-Expression von THP1-Zellen 72 Stunden nach Ko-Kultur

THP1-Zellen wurde 72 Stunden nach der Ko-Kultur mit S2-007-Zellen geerntet und per qRT-PCR die mRNA Expressionslevel der M1/M2-Marker relativ zum Haushaltsgen RPLP0 analysiert. M2-Marker (A) CCL13 und (B) Mannose-Rezeptor. M1-Marker (C) CXCL9 und (D) CXCL10. Es wurden die Mittelwerte \pm Stabw. (n=4) dargestellt. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt, bei dem die grau gekennzeichneten Versuchsgruppen mit der jeweiligen schwarzen Kontrollgruppe verglichen wurden. Nur signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet.

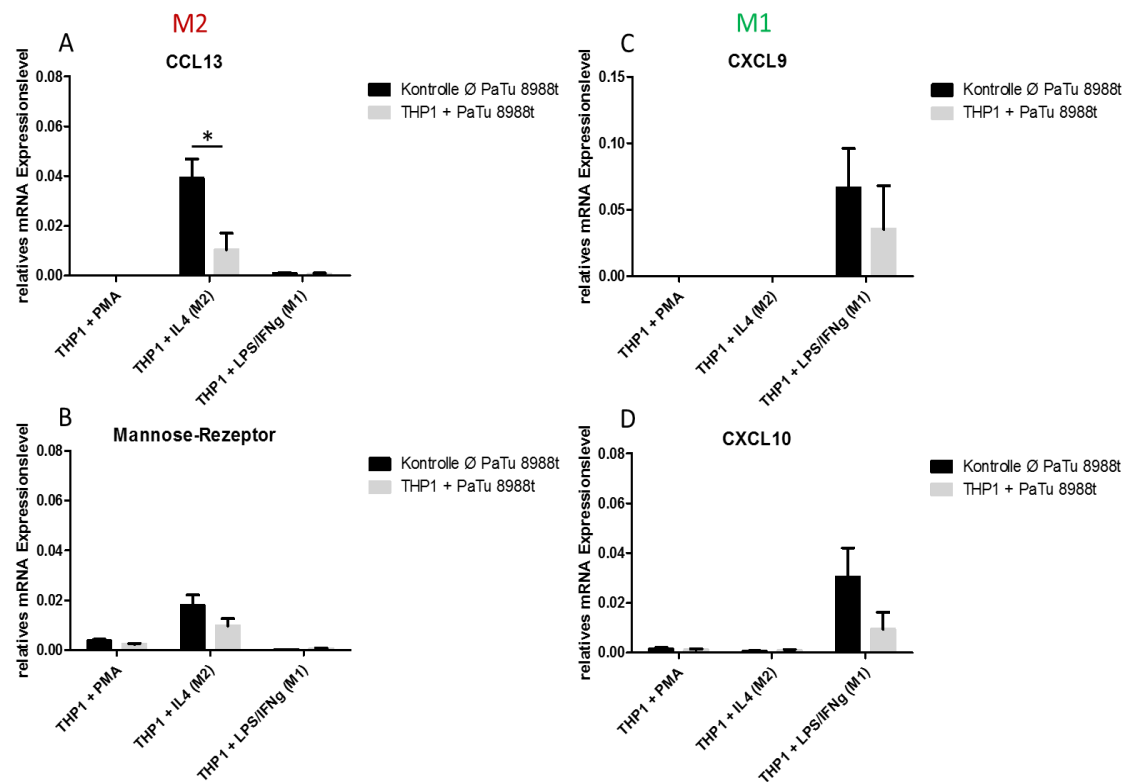


Abbildung 10: Einfluss von PaTu 8988t auf die M1/M2 mRNA-Expression von THP1-Zellen 72 Stunden nach Ko-Kultur

THP1-Zellen wurde 72 Stunden nach der Ko-Kultur mit PaTu 8988t-Zellen geerntet und per qRT-PCR die mRNA Expressionslevel der M1/M2-Marker relativ zum Haushaltsgen RPLP0 analysiert. M2-Marker (A) CCL13 und (B) Mannose-Rezeptor. M1-Marker (C) CXCL9 und (D) CXCL10. Es wurden die Mittelwerte \pm Stabw. (n=4) dargestellt. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt, bei dem die grau gekennzeichneten Versuchsgruppen mit der jeweiligen schwarzen Kontrollgruppe verglichen wurden. Nur signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet.

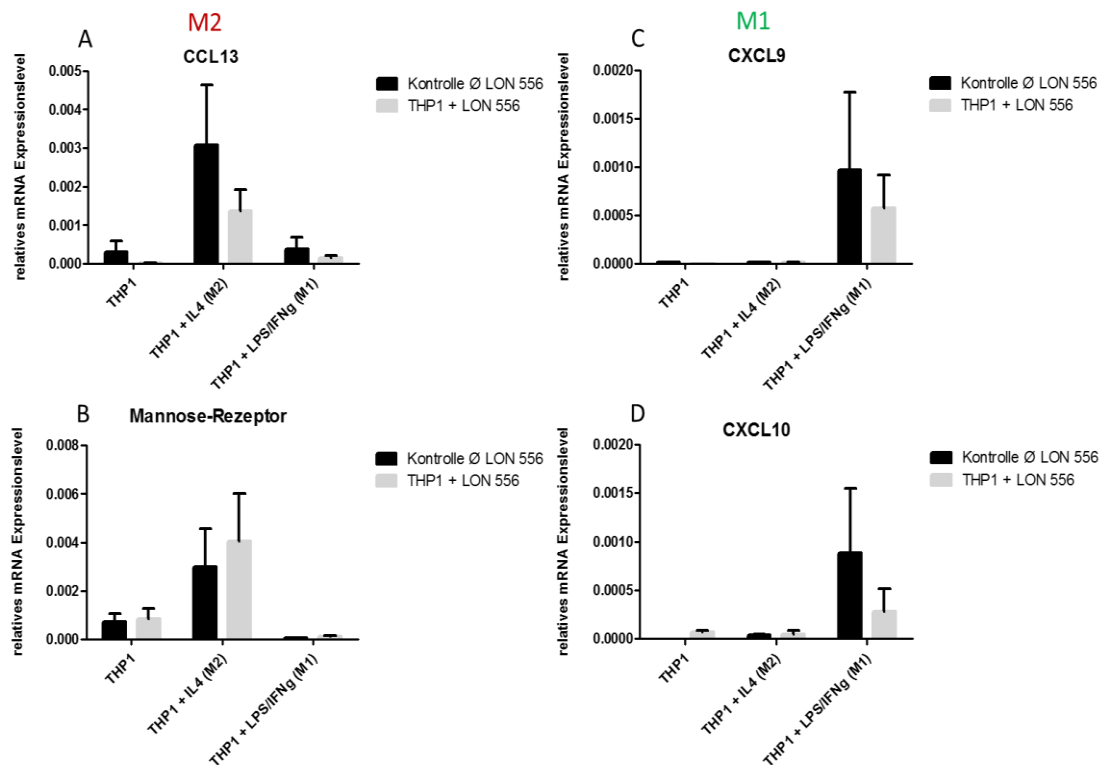


Abbildung 11: Einfluss von LON 556-Zellen auf die M1/M2 mRNA-Expression von THP1-Zellen 72 Stunden nach Ko-Kultur

THP1-Zellen wurden 72 Stunden nach der Ko-Kultur mit LON 556-Zellen geerntet und per qRT-PCR die mRNA Expressionslevel der M1/M2-Marker relativ zum Haushaltsgen RPLP0 analysiert. M2-Marker (A) CCL13 und (B) Mannose-Rezeptor. M1-Marker (C) CXCL9 und (D) CXCL10. Es wurden die Mittelwerte \pm Stabw. ($n=3$) dargestellt. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt, bei dem die grau gekennzeichneten Versuchsgruppen mit der jeweiligen schwarzen Kontrollgruppe verglichen wurden. Nur signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet.

Betrachtet man den Einfluss der Tumorzellen auf polarisierte BlaER1 Makrophagen, so zeigten sich in der real-time PCR-Analyse ähnliche Ergebnisse wie für THP1-Zellen. Der M1-Marker CXCL10 zeigte in LPS/IFN γ induzierten BlaER1-Zellen eine sehr starke Reduktion, während die M1-Marker CXCL9 und CCL2 sich weniger stark unter Ko-Kulturbedingungen mit S2-007, PaTu 8988t und LON 556-Zellen im Vergleich zur Kontrolle reduzierten (Abbildung 12, 13 und 14 (D, E und F)).

Im Gegensatz zu den THP1-Zellen zeigten die BlaEr1 + IL-4 unter Ko-Kultur mit S2-007 und PaTu 8988t eine noch stärkere Reduktion der M2-Marker CCL13, Mannose-Rezeptor und CCL18 im Vergleich zu den Kontrollen. Jedoch war keiner der beobachteten Tendenzen statistisch signifikant (Abbildung 12, 13, A, B und C). Lediglich in Abbildung 13 B zeigte sich die Reduktion des Mannose-Rezeptors in LPS/IFN γ induzierten BlaER1-Zellen im Bezug zur Kontrolle als statistisch signifikant.

Ähnlich wie bei der Ko-Kultur THP1+ IL-4 mit LON 556 Zellen, exprimierte auch hier unter Ko-Kultur mit LON 556-Zellen die BlaEr1 + IL-4 im Vergleich zu den anderen Ko-Kulturen mit Tumorzellen vergleichsweise die M2-Marker etwas stärker. Die M2-Marker CCL13 wies nach 72 Stunden Ko-Kultur die geringste Reduktion im Vergleich zum Mannose-Rezeptor und CCL18 im Bezug zur Kontrolle auf (Abbildung 14 A, B und C). Lediglich in Abbildung 14 B zeigte sich eine leichte Zunahme der Mannose-Rezeptor-Expression in LPS/IFN γ induzierten BlaER1-Zellen im Bezug zur Kontrolle als statistisch signifikant. Alle Tendenzen zur Reduktion der M1- und M2-Marker in BlaER1 + LPS/IFN γ oder BlaER1 + IL-4 waren statistisch nicht signifikant.

Zusammenfassend konnte kein klarer Einfluss von Seiten der Tumorzellen auf die M1/M2 Polarisation festgestellt werden. Die transwell-Assays mit verschiedenen Tumorzelllinien zeigten, dass in LPS/IFN γ induzierten THP1- und BlaER1-Zellen der M1-Marker CXCL10 am stärksten reduziert war, während die M1-Marker CXCL9 und CCL2 sich weniger stark reduzierten. Aber auch die M2-Marker zeigten eine deutliche Reduktion unter Ko-Kulturbedingungen in beiden Makrophagensystemen, wobei auch hier die einzelnen Marker unterschiedlich stark reguliert wurden. Insgesamt deuteten diese Ergebnisse eher in Richtung einer De-Polarisierung der Makrophagen durch die Ko-Kultur mit Pankreaskarzinom-Zelllinien als einer verstärkten Polarisation in M1- oder M2.

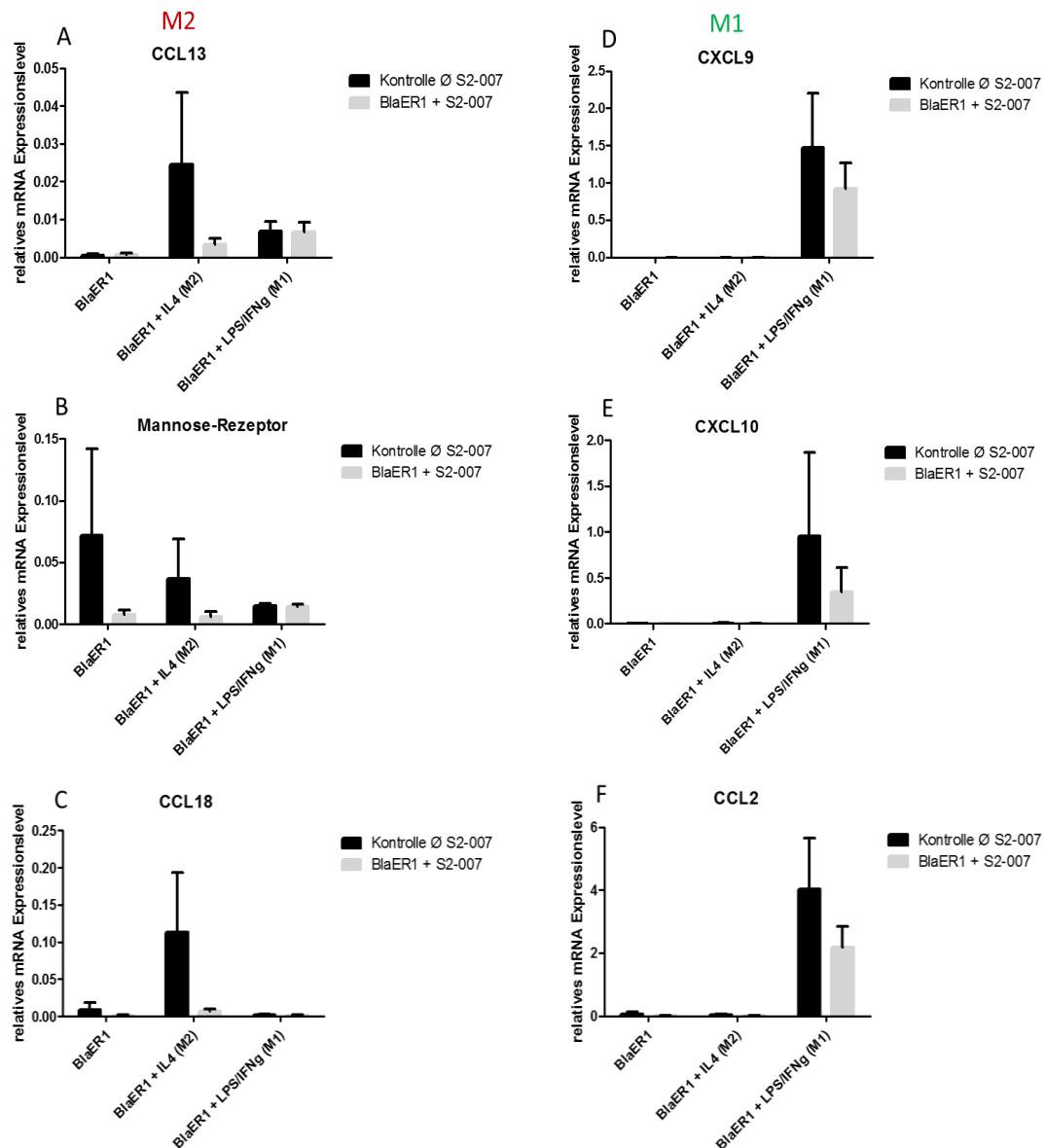


Abbildung 12: Einfluss von S2-007-Zellen auf die M1/M2 mRNA-Expression von BlaER1-Zellen 72 Stunden nach Ko-Kultur

BlaER1-Zellen wurde 72 Stunden nach der Ko-Kultur mit S2-007-Zellen geerntet und per qRT-PCR die mRNA Expressionslevel der M1/M2-Marker relativ zum Haushaltsgen RPLP0 analysiert. M2-Marker (A) CCL13 und (B) Mannose-Rezeptor. M1-Marker (C) CXCL9 und (D) CXCL10. Es wurden die Mittelwerte \pm Stabw. (n=3) dargestellt. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt, bei dem die grau gekennzeichneten Versuchsgruppen mit der jeweiligen schwarzen Kontrollgruppe verglichen wurden. Nur signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet.

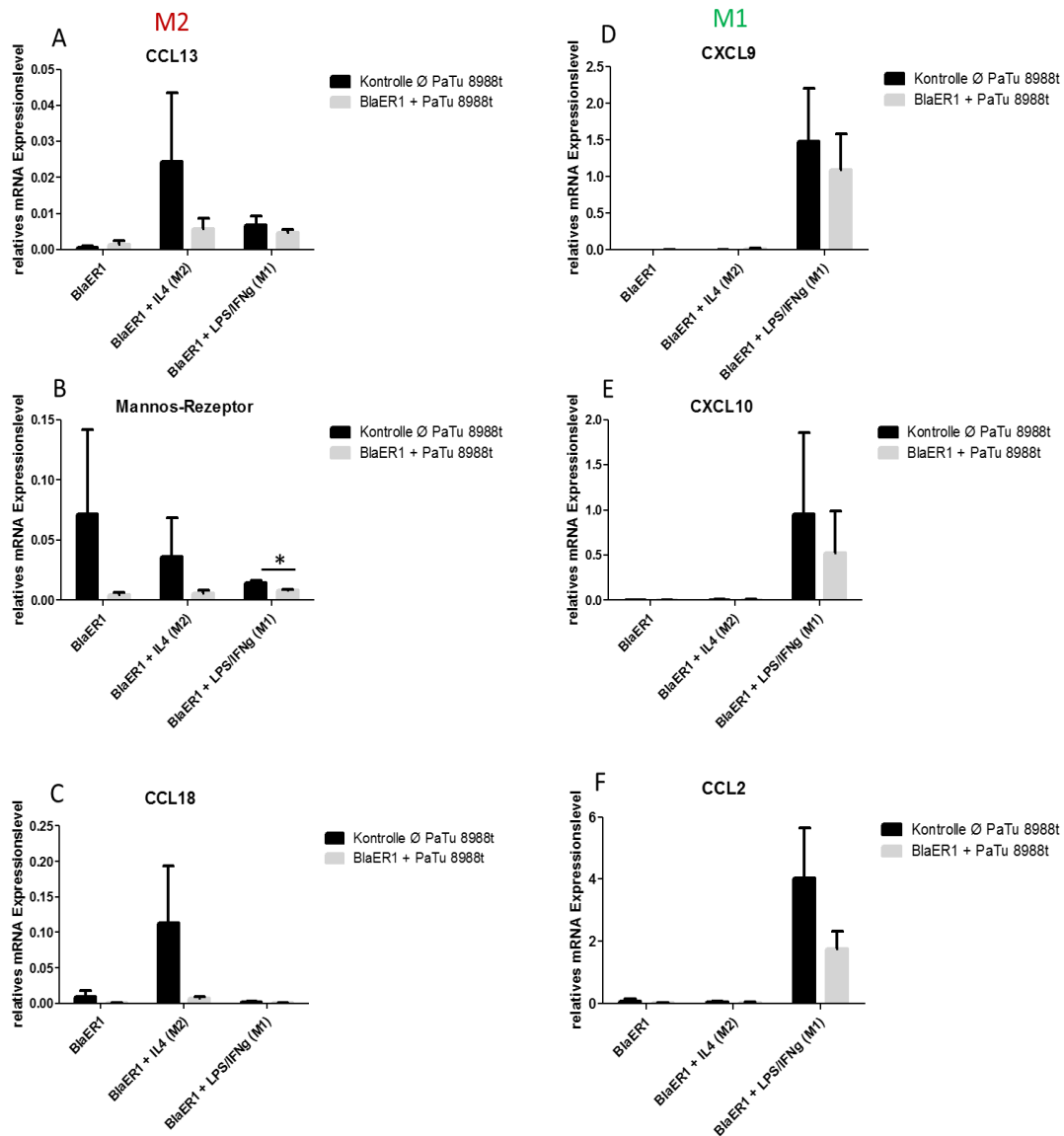


Abbildung 13: Einfluss von PaTu 8988t-Zellen auf die M1/M2 mRNA-Expression von BlaER1-Zellen 72 Stunden nach Ko-Kultur

BlaER1-Zellen wurde 72 Stunden nach der Ko-Kultur mit PaTu 8988t-Zellen geerntet und per qRT-PCR die mRNA Expressionslevel der M1/M2-Marker relativ zum Haushaltsgen RPLP0 analysiert. M2-Marker (A) CCL13 und (B) Mannose-Rezeptor. M1-Marker (C) CXCL9 und (D) CXCL10. Es wurden die Mittelwerte \pm Stabw. (n=3) dargestellt. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt, bei dem die grau gekennzeichneten Versuchsgruppen mit der jeweiligen schwarzen Kontrollgruppe verglichen wurden. Nur signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet.

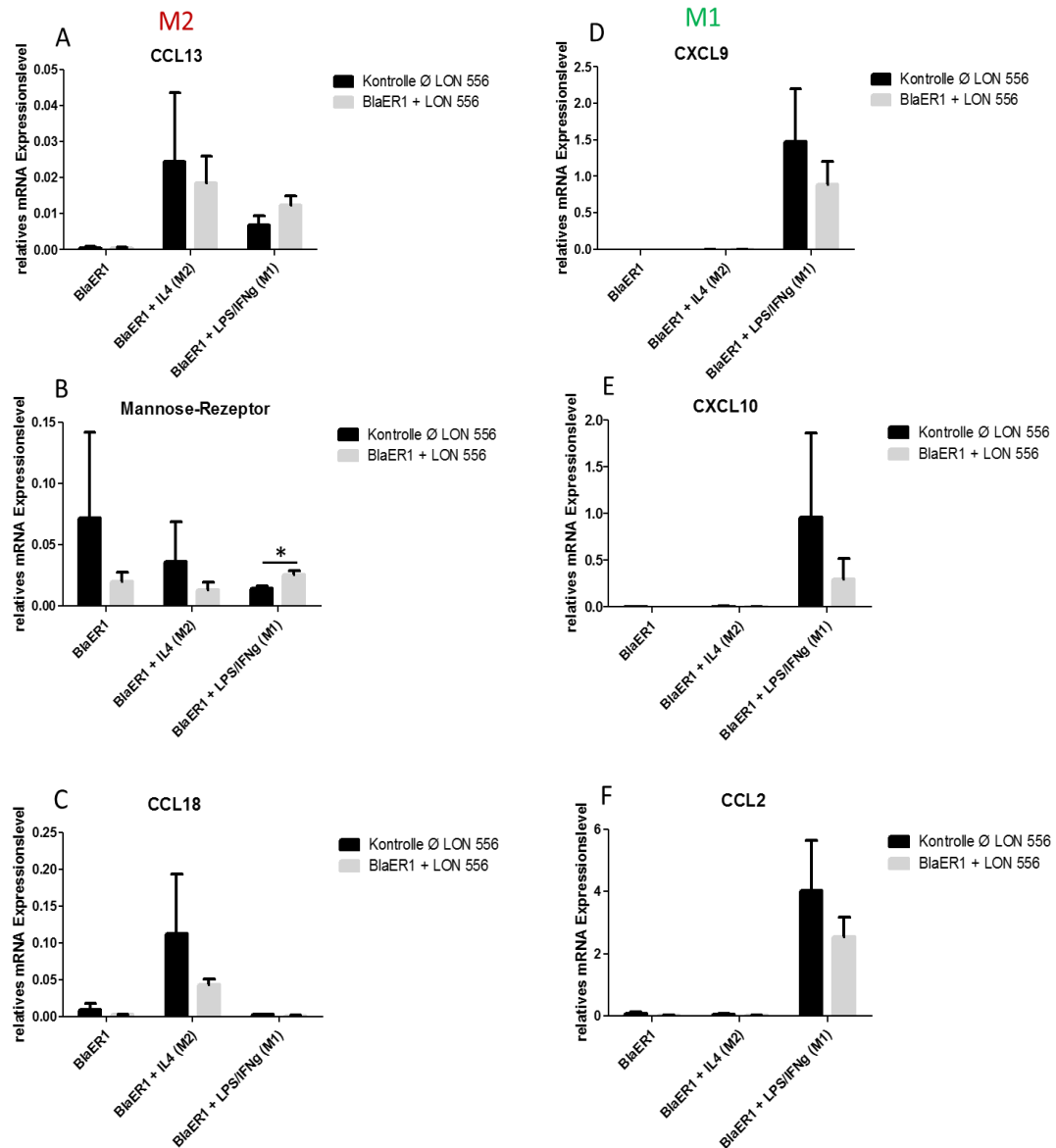


Abbildung 14: Einfluss von LON 556-Zellen auf die M1/M2 mRNA-Expression von BlaER1-Zellen 72 Stunden nach Ko-Kultur

BlaER1-Zellen wurde 72 Stunden nach der Ko-Kultur mit LON 556-Zellen geerntet und per qRT-PCR die mRNA Expressionslevel der M1/M2-Marker relativ zum Haushaltsgen RPLP0 analysiert. M2-Marker (A) CCL13 und (B) Mannose-Rezeptor. M1-Marker (C) CXCL9 und (D) CXCL10. Es wurden die Mittelwerte \pm Stabw. (n=3) dargestellt. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt, bei dem die grau gekennzeichneten Versuchsgruppen mit der jeweiligen schwarzen Kontrollgruppe verglichen wurden. Nur signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet.

3.4 Der Einfluss von konditioniertem Makrophagen-Medium auf Tumorzellen und von konditioniertem Tumorzell-Medium auf Makrophagen

Die Ergebnisse der transwell-Assays hatten gezeigt, dass die Tumorzellen Substanzen sezernieren, welche zu einem ähnlichen Verhalten der THP1- und BlaER1-Zellen unter Ko-Kulturbedingungen führen. Beide Zelllinien verändern ihren Polarisationsstatus unter Ko-Kultur, während eine klare Stimulation in Richtung „klassischer“ M1- oder M2-Polarisation nicht offensichtlich wurde. Die Makrophagen der THP1- und BlaER1-Zellen sezernierten umgekehrt offenbar Substanzen, die das Verhalten der Tumorzellen unter Ko-Kultur unterschiedlich beeinflussten. So reagierten S2-007-Zellen gegenüber LPS/IFN γ polarisierten THP1- oder BlaER1-Zellen mit einer stark verminderten Zellviabilität, während IL-4 induzierte Makrophagen besonders bei S2-007-Zellen und LON 556-Zellen ein leicht verbessertes Zellwachstum bewirkten.

Im nächsten Schritt wurde getestet, ob die Behandlung von Tumorzellen mit konditioniertem Makrophagen-Medium bzw. die Behandlung von polarisierten Makrophagen mit konditioniertem Tumorzell-Medium zu ähnlichen Ergebnissen wie unter Ko-Kulturbedingungen führten.

MTT Assays der mit konditioniertem Medium von THP1- und BlaER1-Makrophagen behandelten Tumorzellen zeigten nahezu die gleichen Ergebnisse wie unter Ko-Kulturbedingungen (Abbildung 15). Auch hier regierten die S2-007-Zellen, behandelt mit LPS/IFN γ polarisierten THP1-/BlaER1-Medium und etwas schwächer die LON 556-Zellen mit LPS/IFN γ polarisierten BlaER1-Medium, mit einer signifikant verringerten Zellviabilität gegenüber der Kontrolle (Abbildung 15 A, E und G). Ebenfalls statistisch signifikant war der Unterschied bei LON 556-Zellen kultiviert mit PMA/transdifferenziertem Makrophagen-Medium im Bezug zur Kontrolle. Dies führte zu einem leicht verbesserten Zellwachstum (Abbildung 15 C und G). Ebenso zeigten S2-007-Zellen/PaTu 8988t kultiviert mit PMA induziertem THP1-Medium oder PaTu 8988t kultiviert mit transdifferenziertem BlaER1-Medium eine Tendenz zu einer erhöhten Zellviabilität (Abbildung 15 A, B und F). Dies galt auch für S2-007-/LON556-Zellen kultiviert mit IL-4 induziertem Makrophagen-Medium (Abbildung 15 A, C, E und G).

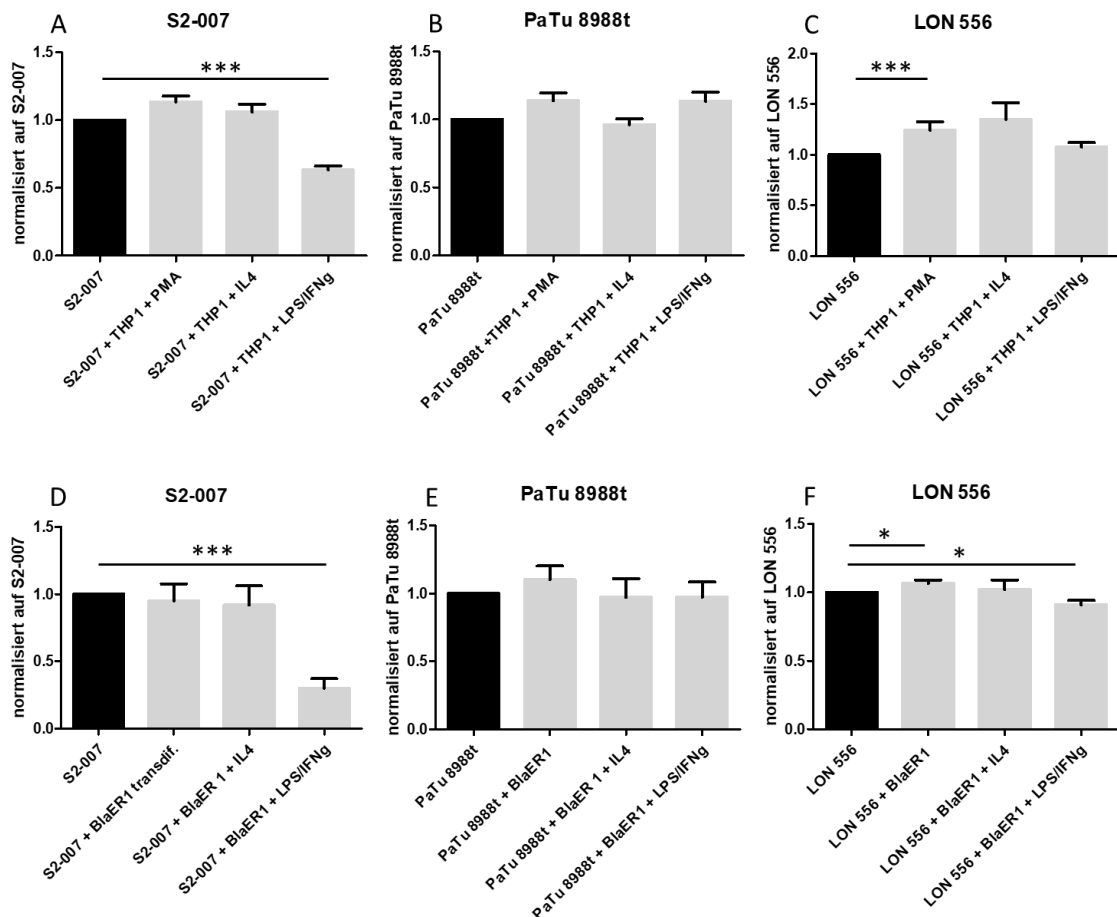


Abbildung 15: Viabilität der Tumorzellen 72 Stunden nach Behandlung mit konditioniertem polarisiertem THP1/BlaER1-Medium

Die Zellviabilität der Tumorzelllinien wurde 72 Stunden nach der Inkubation mit konditioniertem THP1-/BlaER1-Medium mittels MTT-Assay überprüft und die gemessenen Werte normalisiert auf die jeweilige Kontroll-Tumorzelllinie dargestellt. Kultivierung Tumorzelllinien (A) S2-007, (B) PaTu 8988t und (C) LON 556 mit konditioniertem polarisiertem THP1-Medium. Kultivierung Tumorzelllinien (D) S2-007, (E) PaTu 8988t und (F) LON 556 mit konditioniertem polarisiertem BlaER1-Medium. Es werden die Mittelwerte \pm Stabw. (n=4) dargestellt.

Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt, bei dem die grau gekennzeichneten Versuchsgruppen mit der jeweiligen schwarzen Kontrollgruppe verglichen wurden. Nur signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet.

Bei der Behandlung der THP1 Makrophagen mit konditioniertem Medium der Tumorzellen S2-007 und PaTu 8988t war zu erkennen, dass wie unter Ko-Kulturbedingungen LPS/IFN γ polarisierten THP1-Zellen im Vergleich zur Kontrolle eine starke Reduktion der M1-Marker CXCL9 und CXCL10 zeigten (Abbildung 16 C und D). Bei den M2-Markern in IL-4 polarisierten THP1-Zellen nach Behandlung mit konditioniertem Medium der Tumorzellen S2-007 und PaTu 8988t dagegen war nur der Mannose-Rezeptor signifikant reduziert (Abbildung 16 B). Im Gegensatz dazu zeigte der CCL13-Marker in den IL-4 polarisierten THP1-Zellen nach Behandlung mit

konditioniertem Medium der S2-007 und PaTu 8988t Zellen kaum noch einen Unterschied zur Kontrolle bzw. sogar eine leichte Erhöhung (Abbildung 16 A).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Tumorzellen in den MTT Assays nach Behandlung mit konditioniertem Medium der THP1- bzw. BlaER1-Zellen nahezu wie unter Ko-Kulturbedingungen reagierten. Dagegen war der M2-Satus der THP1-Zellen nach Behandlung mit konditioniertem Medium der S2-007-Zellen und PaTu 8988t-Zellen deutlich stabiler verglichen mit der Ko-Kultur, da hier nur noch der Mannose-Rezeptor nach Behandlung reduziert erschien, während der tumorassoziierte Marker CCL13 kaum noch einen Unterschied zur Kontrolle aufwies. Lediglich die M1-Marker waren nach Behandlung mit konditioniertem Medium genauso stark vermindert wie unter Ko-Kulturbedingungen.

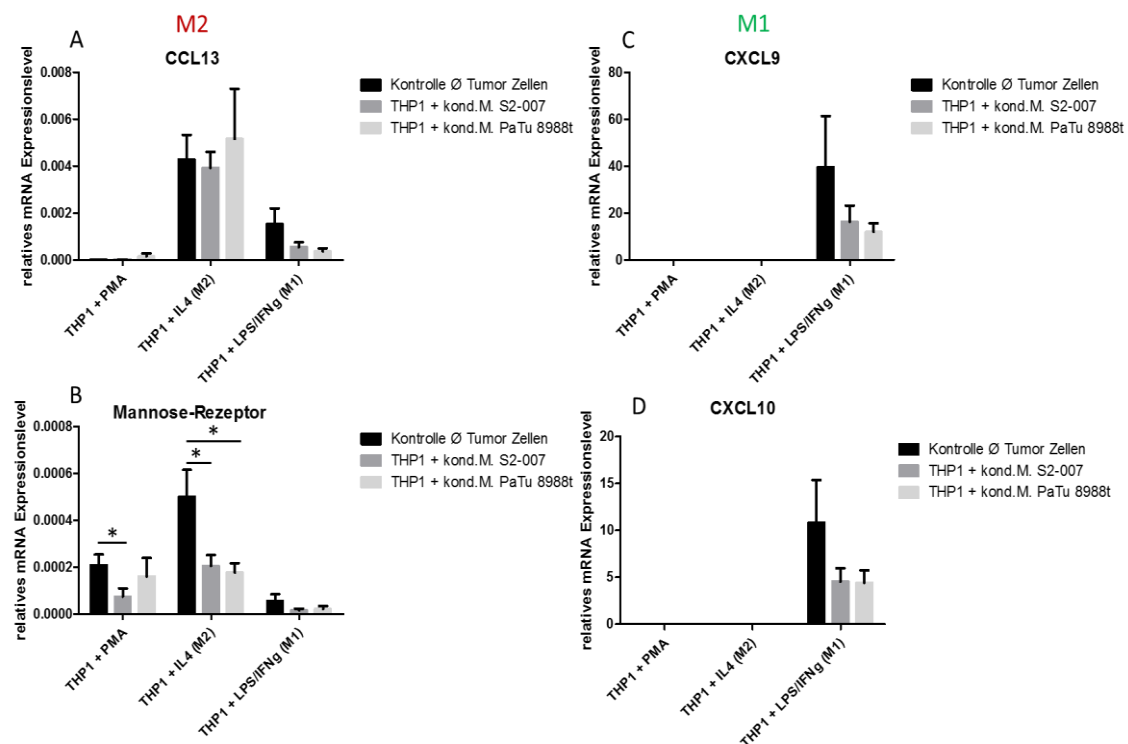


Abbildung 16: M1/M2 mRNA-Expression von THP1-Zellen 24 Stunden nach Behandlung mit konditioniertem S2-007-/PaTu 8988t-Medium

THP1-Zellen wurde 24 Stunden nach der Behandlung mit konditioniertem S2-007-/PaTu 8988t-Medium geerntet und per qRT-PCR die mRNA Expressionslevel der M1/M2-Marker relativ zum Haushaltsgen RPLP0 analysiert. M2-Marker (A) CCL13 und (B) Mannose-Rezeptor. M1-Marker (C) CXCL9 und (D) CXCL10. Es wurden die Mittelwerte \pm Stabw. (n=6) dargestellt. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt, bei dem die grau gekennzeichneten Versuchsgruppen mit der jeweiligen schwarzen Kontrollgruppe verglichen wurden. Nur signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet.

3.5 Charakterisierung der Isolation von extrazellulären Vesikeln aus Pankreaskarzinom- Zelllinien und Makrophagen

Da die Ergebnisse der Behandlung von Tumorzellen und Makrophagen mit konditioniertem Medium sogar noch ausgeprägtere Effekte zeigten als unter Ko-Kulturbedingungen, konnte angenommen werden, dass die beschriebenen Effekte sowohl von Tumor- als auch von Makrophagenseite durch zellsezernierte Substanzen vermittelt wurden. Da vermutet wird, dass extrazelluläre Vesikel an der Zell-Zell-Interaktion maßgeblich beteiligt sind (Ratajczak et al. 2006; Simpson et al. 2009), wurde als Nächstes die Isolation von extrazellulären Vesikeln aus Tumor- und Makrophagen-Zelllinien etabliert. Die Validierung dieser Methode erfolgte mittels Elektronenmikroskopie, Nanoparticle Tracking Analyse (NTA) und Western Blot (siehe Punkt 2.2.3 und 2.2.6).

In Abbildung 17 A, B und C sind Exosomen aus den Zelllinien S2-007 und THP1 + IL 4 dargestellt. Die Membranvesikel wiesen eine für Exosomen typisch napfförmige Struktur auf und lagen wie von Gould und Raposo beschrieben in einem Größenbereich von 30 bis 100 nm, (Gould and Raposo 2013).

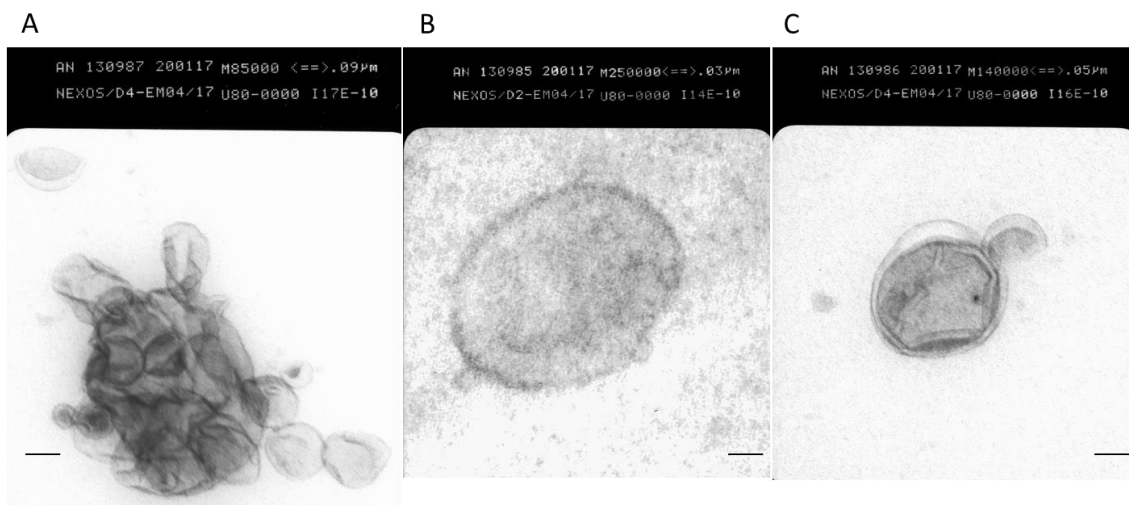


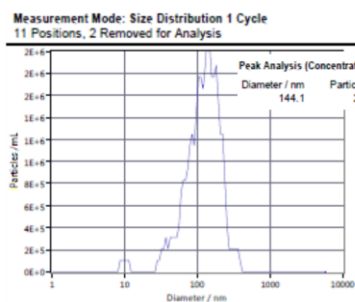
Abbildung 17: Elektronenmikroskopie von Exosomen

Zur Darstellung der Struktur und Größe der Vesikel wurde von S2-007-Zellen und THP1 + IL-4 aus je 80 mL Mediumüberstand Exosomen isoliert und eine elektronenmikroskopische Aufnahme gemacht.

- (A) Exosomen aus THP1 + IL-4, 85000-fache Vergrößerung, Balken entspricht 0,09 μm .
- (B) Exosom aus S2-007-Zellen, 25000-fache Vergrößerung, Balken entspricht 0,03 μm .
- (C) Exosom aus THP1 + IL-4, 40000-fache Vergrößerung, Balken entspricht 0,05 μm .

Mit der NTA-Methode kann die durchschnittliche Größe (Graph-Auftragung Partikel/mL gegen Durchmesser/nm) und die Menge/mL an Partikeln in der jeweiligen Probe bestimmen werden. Bei der Berechnung wird auch die Verdünnung der gemessenen Probe berücksichtigt. In den Abbildungen 18, 19 und 20 ist beispielhaft je eine NTA-Analyse der Zelllinie S2-007, PaTu 8988t, LON 556, THP1-M2 und BlaER1-M2 dargestellt. So konnten aus ca. 80 mL S2-007-Zellüberstand $3,5 \times 10^{10}$ extrazelluläre Vesikel mit einer durchschnittlichen Größe von 144 nm isoliert werden. Für die PaTu 8988t ergab sich eine ähnliche Menge von $1,1 \times 10^{10}$ mit einer durchschnittlichen Größe von 36 bis 144 nm (Abbildung 18 A und B). Die größte Menge an Exosomen konnten aus LON-Zellen gewonnen werden, mit einer Menge von $2,2 \times 10^{11}$ für LON 556. Die Größe der Exosomen lag bei ca. 170 nm (Abbildung 19 A und B). Die geringste Menge konnte aus THP1- und BlaER1-Zellen gewonnen werden. Die Exosomen der THP1-Zellen lagen bei $3,7 \times 10^9$ und die BlaER1-Zellen bei $1,9 \times 10^9$ Partikel/mL. Bei beiden Zelllinien wiesen die Vesikel eine durchschnittliche Größe von 133 nm auf (Abbildung 20 A und B).

A S2-007



B PaTu 8988t

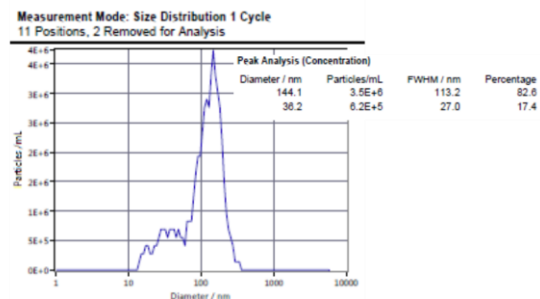
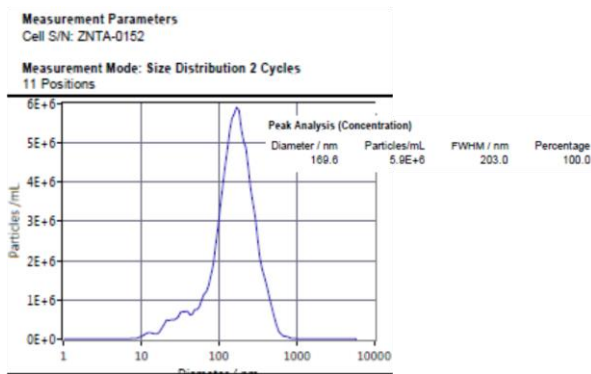


Abbildung 18: NTA-Analyse von S2-007 und PaTu 8988t Exosomen

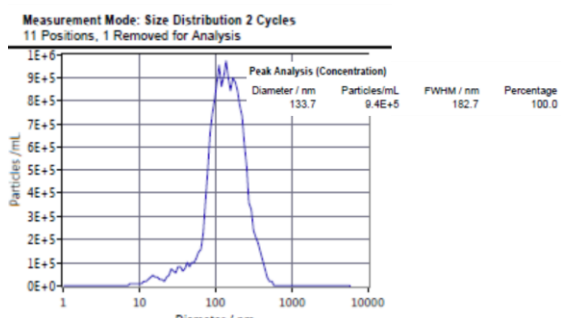
Zur Bestimmung der Partikelmenge der Vesikel aus 80 mL Mediumüberstand von (A) S2-007 und (B) PaTu 8988t wurde eine NTA-Analysen durchgeführt. Die NTA-Analyse gibt Auskunft über die durchschnittliche Größe (Graph-Auftragung Partikel/mL gegen Durchmesser/nm) und die Menge/mL an Partikel in der jeweiligen Probe (unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe).

A LON 556

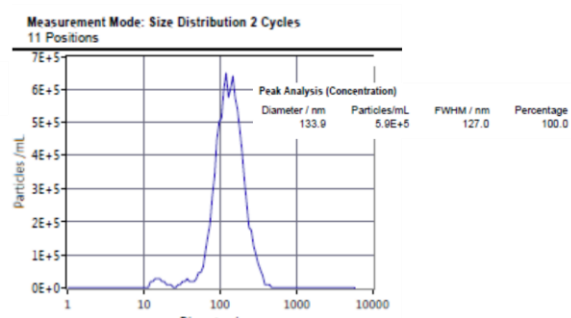
**Abbildung 19: NTA-Analyse von LON 556 Exosomen**

Zur Bestimmung der Partikelmenge der Vesikel aus 80 mL Mediumüberstand von (A) LON 556 wurde eine NTA-Analysen durchgeführt. Die NTA-Analyse gibt Auskunft über die durchschnittliche Größe (Graph-Auftragung Partikel/mL gegen Durchmesser/nm) und die Menge/mL an Partikel in der jeweiligen Probe (unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe).

A THP1M2



B BlaER1M2

**Abbildung 20: NTA-Analyse von THP1-M2 und BlaER1-M2 Exosomen**

Zur Bestimmung der Partikelmenge der Vesikel aus 80 mL Mediumüberstand von (A) THP1 M2 und (B) BlaER1 M2 wurde eine NTA-Analysen durchgeführt. Die NTA-Analyse gibt Auskunft über die durchschnittliche Größe (Graph-Auftragung Partikel/mL gegen Durchmesser/nm) und die Menge/mL an Partikel in der jeweiligen Probe (unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe).

Eine weitere Methode zur Validierung der Vesikel-Isolation war der Western Blot. Abbildung 21 zeigt beispielhaft den Western Blot von S2-007, PaTu 8988t und THP1 Exosomen sowie von Gesamtzelllysaten. So waren die isolierten Exosomen von S2-007, PaTu 8988t und THP1-Zellen positiv für die Marker CD63 und Flotillin. Der Marker CD63 trat deutlich angereichert in Exosomen von S2-007 und THP1-Zellen auf, während sich dieser nur sehr schwach in den PaTu 8988t Exosomen zeigte. Erwartungsgemäß gering war viel der Nachweis für die Negativkontrollen GM 130 (Golgematrix-Protein), und leicht positiv für die Negativkontrollen Histon-3 und β -Actin in den Exosomen der S2-007- und PaTu 8988t-Zellen aus, bei denen erwartet wird, dass diese Marker in Exosomen gar nicht bzw. nur sehr schwach im Vergleich zum

Gesamtzelllysate vorkommen. Für die THP1-Zellen lagen keine Ergebnisse für die Negativkontrollen β -Actin und Histone-3 vor. Im Vergleich zu den Exosomen waren die Gesamtzelllysate von S2-007, PaTu 8988t und THP1-Zellen für alle Marker deutlich positiv.

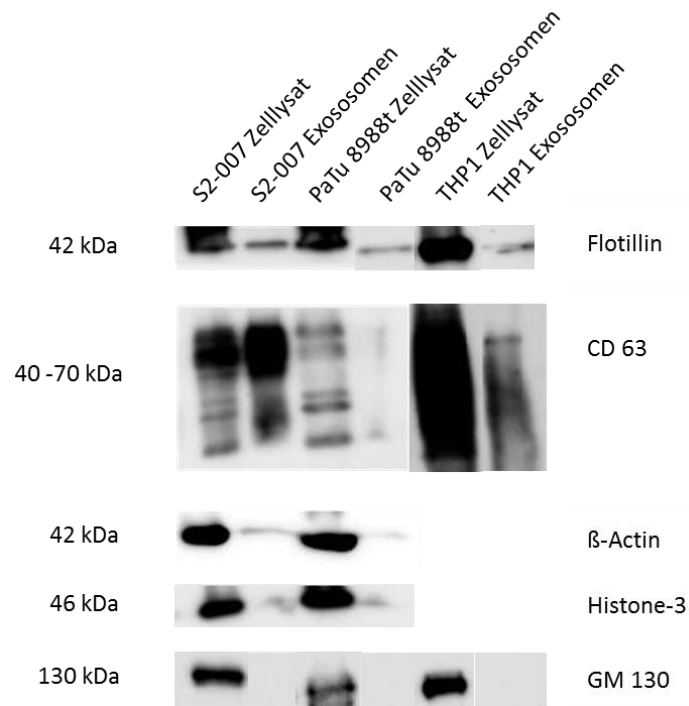


Abbildung 21: Western Blot Analyse von Exosomen und Gesamtzelllysate

Immunoblot-Analyse von Gesamtzelllysaten und Exosomen der Zelllinien S2-007, PaTu 8988t und THP1. Die Exosomen wurden 48 Stunden nach Mediumwechsel auf RPMI ohne FCS aus dem Mediumüberstand isoliert und anschließend aus den Vesikeln und den Zellen Gesamtprotein isoliert. Getestet wurden die Marker Flotillin, CD63 β -Actin, Histone 3 und GM 130 (Golgi-Matrixprotein).

3.6 Tumorzell-Exosomen-Behandlung beeinflusst M2-Marker Expression in M2-polarisierten THP1-/BlaER1-Makrophagen

Um zu überprüfen, ob Tumorzell-sezernierte Exosomen tatsächlich einen Einfluss auf die Polarisation von Makrophagen ausüben, erfolgte nach der Etablierung zur extrazellulären Vesikel-Isolation die direkte Behandlung von polarisierten THP1-/BlaER1-Makrophagen mit isolierten extrazellulären Vesikeln aus Pankreaskarzinom-Zelllinien.

Die Behandlung von Makrophagen mit Vesikeln erfolgte im 6-Well Format. THP1- bzw. BlaER1-Zellen wurden dafür wie unter 2.2.4 b) beschrieben mit PMA behandelt oder transdifferenziert und anschließend in den M1- und M2-Typ polarisiert. Extrazelluläre Vesikel wurden wie unter Punkt 2.2.6 beschrieben von Pankreaskarzinom-Zelllinien (S2-007, PaTu 8988t, LON 556 und LON 560) isoliert und das Vesikel-Pellet in je 150 µL HBSS resuspendiert. Während der Vesikelisolation wurden je 150 µL des vesikelfreien Mediumsüberstandes zur Kontrollbehandlung zurückbehalten. Nach sechs Stunden Polarisation wurden THP1 und BlaER1 Makrophagen mit Vesikeln behandelt und für 24 Stunden inkubiert. Zur Kontrolle wurde ein Satz der Versuchsgruppen mit vesikelfreiem Mediumüberstand behandelt, während ein weiterer Satz der Versuchsgruppen nach der Polarisation einfach unbehandelt für 24 Stunden weiter kultiviert wurde. Nach der Inkubationszeit wurden aus den Zellen jeder Versuchsbedingung RNA isoliert (siehe Punkt 2.2.2 a), cDNA-Synthese (siehe Punkt 2.2.2 c) durchgeführt und die Expression der M1-Marker (CXCL9, CXCL10, CCL2) und M2-Marker (CCL18, CCL13, CCL17 und Mannose-Rezeptor) mittels real-time PCR (siehe Punkt 2.2.2 e1) überprüft.

Der tumorassoziierte M2-Marker CCL13 in IL-4 polarisierten THP1-Zellen zeigte nach 24-stündiger Inkubation mit Exosomen aus S2-007, PaTu 8988t, Panc1 und LON 556-Zellen im Vergleich zur Kontrolle ohne Exosomen einen deutlichen Anstieg. Die Behandlung mit Pankreaskarzinom-Zellmedium, aus dem die Exosomen bereits isoliert wurden, hatten keinen M2-fördernden Einfluss auf die THP1-Zellen (Abbildung 22 A, C, E und G). Nur bei den LON 556-Zellen schien dieses Medium ähnlich wie bei den Exosomen eine M2-fördernde Wirkung zu haben (Abbildung 22 G). In LPS/IFN γ induzierte THP1-Zellen führte lediglich die Exosomenbehandlung von Panc1 und S2-007-Zellen zu einer leichten Begünstigung des M1-Status, während in PMA induzierten THP1-Zellen die Exosomenbehandlung mit Panc1 und PaTu 8988t die den

Makrophagenstatus verstärkte. Keiner der beobachteten Unterschiede war formal signifikant (Abbildung 22 A, C und E).

Betrachtete man im Gegenzug die relative Expression des Mannose-Rezeptors, so zeigten sich bei diesem Marker nach Exosomenbehandlung unterschiedliche Effekte auf dessen Expression in IL-4 polarisierten THP1-Zellen. Die Behandlung mit Exosomen aus S2-007, PaTu 8988t und LON 560-Zellen führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer verminderten Expression des Mannose-Rezeptors in IL-4 induzierten THP1-Zellen, während die Behandlung mit Medium ohne Exosomen keinen Einfluss auf den Polarisationsstatus hatte (Abbildung 22 B, D und J). Exosomen aus Panc1-Zellen führten dagegen zu einer leichten Überexpression des Rezeptors in IL-4 induzierten THP1-Zellen, wobei Exosomen aus LON 556 Zellen keinen Einfluss auf die Expression des Rezeptors ausübten (Abbildung 22 F und H). Die Behandlung mit Exosomen oder exosomenfreiem Medium führte überwiegend zu keiner positiven Beeinflussung des Polarisationsstatus von PMA oder LPS/IFN γ induzierten THP1-Zellen (Abbildung 22 D bis H). Lediglich die Behandlung mit exosomenfreiem Medium aus S2-007-Zellen führte zu einer leichten Unterstützung des M2-Polarisationsstatus in PMA induzierten THP1-Zellen (Abbildung 22 B). Keiner der beobachteten Unterschiede war dabei statistisch signifikant.

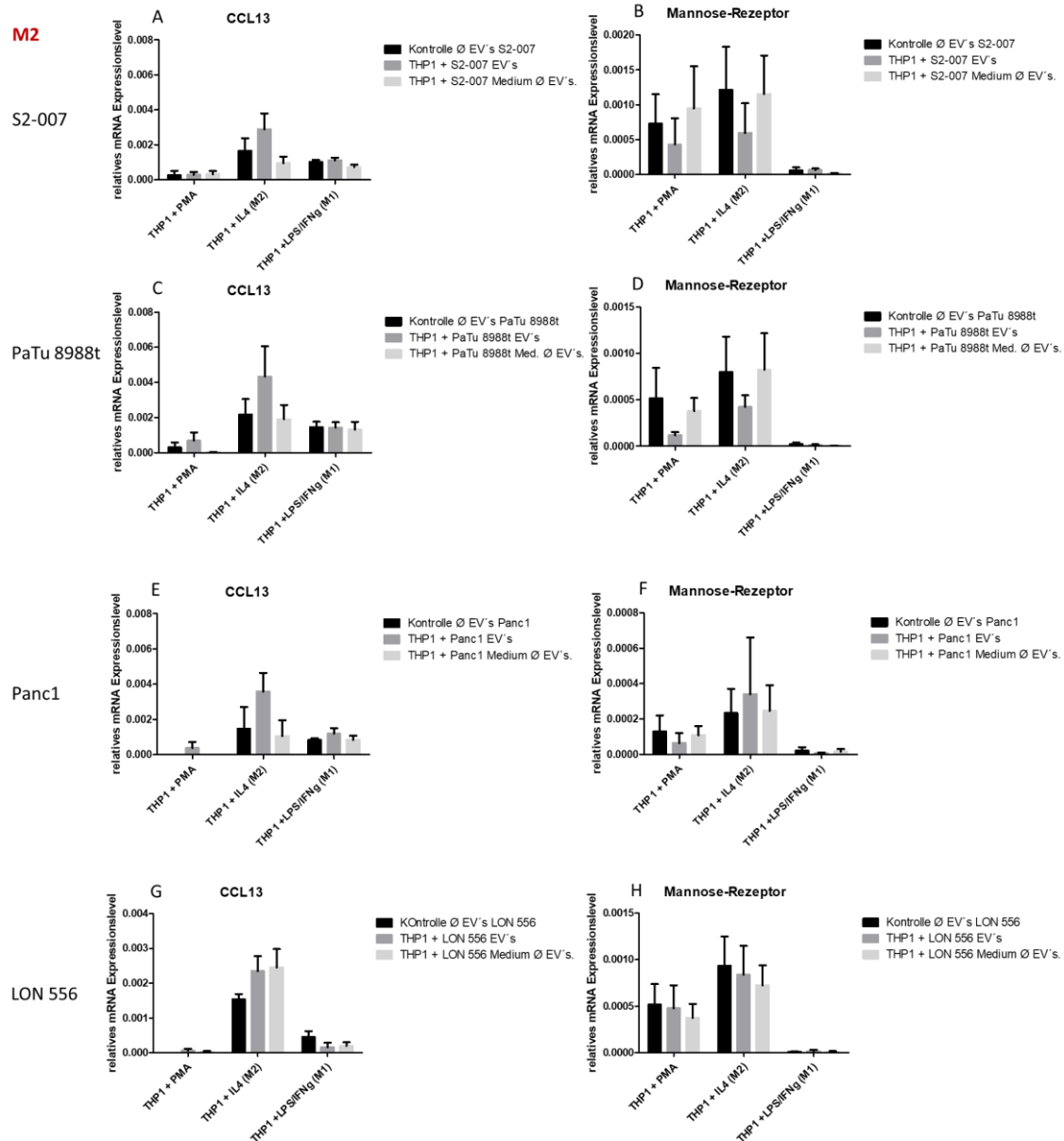


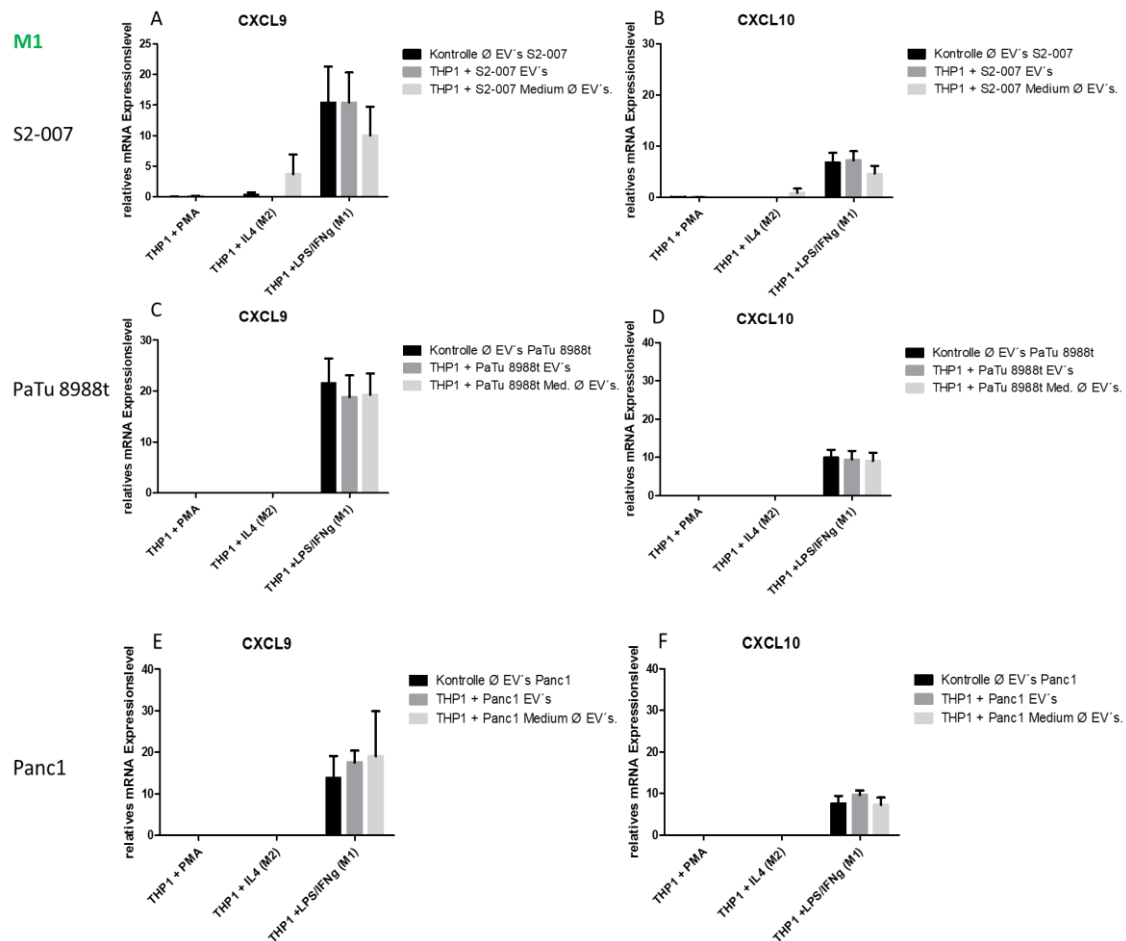
Abbildung 22: Exosomen aus Pankreaskarzinom-Zelllinien beeinflussen die relative

Expression des tumorassoziierten M2-Markers CCL13 in M2-polarisierten THP1-Zellen

THP1-Zellen wurde 24 Stunden nach der Behandlung mit Pankreaskarzinomzell-Exosomen geerntet und per qRT-PCR die mRNA Expressionslevel der M2-Marker relativ zum Haushaltsgen RPLP0 analysiert. THP1-Behandlung mit S2-007 Exosomen M2-Marker (A) CCL13 und (B) Mannose-Rezeptor, (n=6); THP1-Behandlung mit PaTu 8988t Exosomen M2-Marker (C) CCL13 und (D) Mannose-Rezeptor, (n=5); THP1-Behandlung mit Panc1 Exosomen M2-Marker (E) CCL13 und (F) Mannose-Rezeptor, (n=2); THP1-Behandlung mit LON 556 Exosomen M2-Marker (G) CCL13 und (H) Mannose-Rezeptor, (n=5);

Es wurden die Mittelwerte \pm Stabw. dargestellt. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt, bei dem die grau gekennzeichneten Versuchsgruppen mit der jeweiligen schwarzen Kontrollgruppe verglichen wurden. Nur signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet.

Im Vergleich zu den M2-Markern zeigte sich, dass überwiegend weder die Behandlung mit Exosomen noch mit exosomenfreiem Medium aus Pankreaskarzinom-Zelllinien den Polarisationsstatus in LPS/IFN γ induzierten THP1-Zellen im Vergleich zur Kontrolle nennenswert beeinflussten (Abbildung 23 A bis H). Nur die Behandlung von Panc1 Exosomen führte zu einer leichten Begünstigung der Expression des CXCL9 und CXCL10 Markers in LPS/IFN γ induzierten THP1-Zellen (Abbildung 23 E). Lediglich in IL-4 induzierten THP1-Zellen führte die Behandlung mit exosomenfreiem Medium aus S2-007-Zellen zu einer verstärkten Expression der Marker CXCL9 und CXCL10 (Abbildung 23 A, B). Eine erhöhte Expression des CXCL9 Marker zeigte sich auch in LPS/IFN γ induzierten THP1-Zellen nach der Behandlung mit exosomenfreiem Medium aus Panc1-Zellen (Abbildung 23 E)



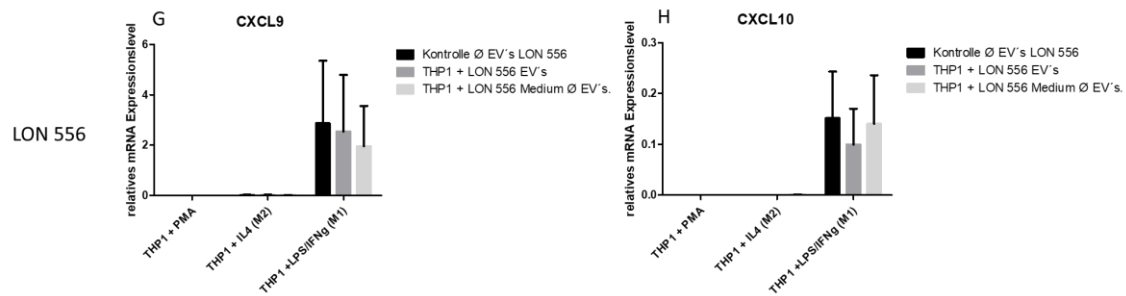


Abbildung 23: Exosomen aus Pankreaskarzinom-Zelllinien haben keinen Einfluss auf die relative Expression der M1-Marker in M1-polarisierten THP1-Zellen

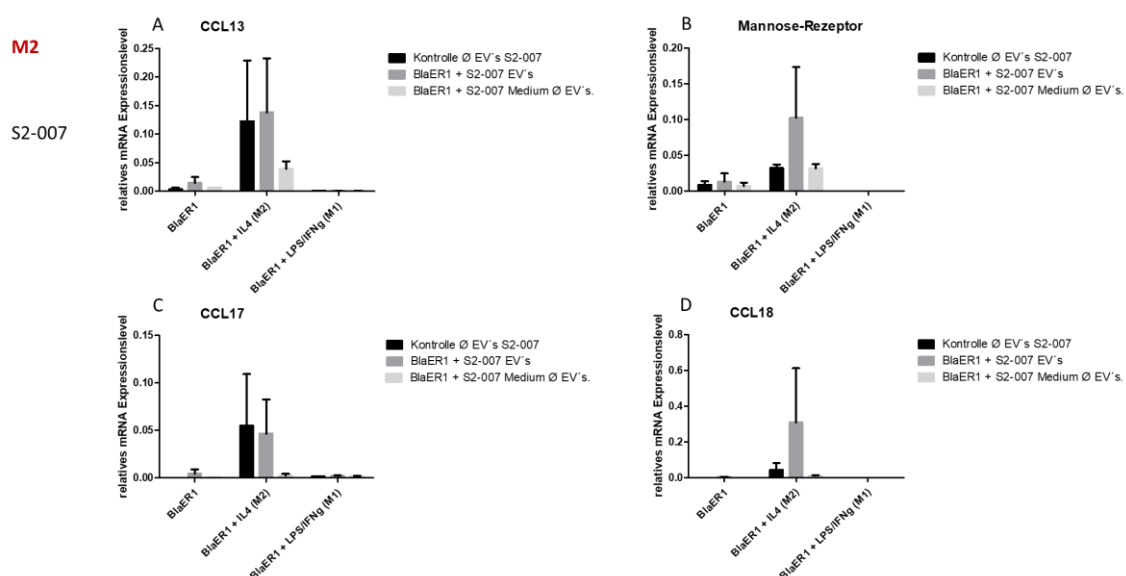
THP1-Zellen wurde 24 Stunden nach der Behandlung mit Pankreaskarzinomzell-Exosomen geerntet und per qRT-PCR die mRNA Expressionslevel der M1-Marker relativ zum Haushaltsgen RPLP0 analysiert. THP1-Behandlung mit S2-007 Exosomen M1-Marker (A) CXCL9 und (B) CXCL10, (n=6); THP1-Behandlung mit PaTu 8988t Exosomen M1-Marker (C) CXCL9 und (D) CXCL10, (n=5); THP1-Behandlung mit Panc1 Exosomen M1-Marker (E) CXCL9 und (F) CXCL10, (n=2); THP1-Behandlung mit LON 556 Exosomen M1-Marker (G) CXCL9 und (H) CXCL10, (n=5); Es wurden die Mittelwerte \pm Stabw. dargestellt. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt, bei dem die grau gekennzeichneten Versuchsgruppen mit der jeweiligen schwarzen Kontrollgruppe verglichen wurden. Nur signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet.

Die Behandlung mit Exosomen aus den verschiedenen Pankreaskarzinom-Zelllinien hatte unterschiedliche Effekte auf die Expression der M2-Marker CCL13, Mannose-Rezeptor, CCL17 und CCL18 in den BlaEr1-Zellen im Vergleich zu den THP1-Zellen. So führte die Behandlung mit Exosomen aus S2-007-Zellen zu einer deutlich erhöhten Expression des Mannose-Rezeptors und CCL18, während CCL13 und CCL17 kaum einen Unterschied in IL-4 induzierten BlaER1-Zellen im Vergleich zur Kontrolle zeigten (Abbildung 24 A bis D). In den unbehandelten induzierten BlaER1-Zellen begünstigten die Exosomen aus S2-007-Zellen lediglich die CCL13 und CCL17 Expression (Abbildung 24 A und C), während in LPS/IFN γ induzierten BlaER1-Zellen die Exosomenbehandlung keinen Einfluss auf den Polarisationsstatus hatte (Abbildung 24 A bis D). Auch nach der Behandlung mit Medium ohne Exosomen war weder in IL-4 induzierten noch in unbehandelten oder LPS/IFN γ induzierten BlaER1-Zellen ein Einfluss auf den Polarisationsstatus im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten (Abbildung 24 A bis D).

Exosomen aus PaTu 8988t führten dagegen zu einer erhöhten Expression des Mannose-Rezeptors, während der CCL18 Marker eine stark verminderte Expression aufwies und die anderen M2-Marker CCL13 und CCL17 keine veränderte Expression in IL-4 induzierten BlaER1-Zellen zeigten (Abbildung 24 E bis H). Die Behandlung mit PaTu 8988t-Exosomen zeigte lediglich in unbehandelten BlaER1-Zellen eine Zunahme der Mannose-Rezeptor-Expression und in LPS/IFN γ induzierten BlaER1-Zellen eine

verstärkte Expression des CCL17 Markers (Abbildung 24 F und G). Die Behandlung mit exosomenfreiem Medium zeigte dagegen nur beim Mannose-Rezeptor einen positiven Einfluss auf das Expressionslevel in unbehandelten und IL-4 induzierten BlaER1-Zellen (Abbildung 24 F). Auf die Expression der anderen Marker hatte in unbehandelte und LPS/IFN γ induzierten BlaER1-Zellen das Medium ohne Exosomen keinen Einfluss (Abbildung 24 E, G und H).

Die Behandlung mit LON 556-Exosomen zeigte ähnlich wie bei den S2-007 Exosomen eine erhöhte Expression des M2-Marker CCL18 und zusätzlich auch des CCL13 und CCL17 Markers in IL-4 induzierten BlaER1-Zellen, während der Mannose-Rezeptor kaum eine veränderte Expression im Vergleich zur Kontrolle aufwies (Abbildung 24 I, J, K und L). Die Behandlung mit Medium ohne Exosomen führte nur beim CCL13 Marker in IL-4 induzierten BlaER1-Zellen zu einem ebenso positiven Einfluss auf das relative Expressionslevel wie die Behandlung mit Exosomen (Abbildung 24 I). Dagegen reagierten die anderen M2-Marker Mannose-Rezeptor und CCL18 mit keinem Expressionsunterschied, während der CCL17 Marker in IL-4 induzierten BlaER1-Zellen eine leicht erhöhte Expression im Vergleich zur Kontrolle zeigte, wenn auch nicht so stark wie nach Exosomenbehandlung (Abbildung 24 J, K und L). Die Behandlung mit Exosomen oder exosomenfreiem Medium aus LON 556 Zellen hatten überwiegend keinen Einfluss auf den Polarisationsstatus von unbehandelten oder LPS/IFN γ induzierten BlaER1-Zellen, lediglich in unbehandelten BlaER1-Zellen zeigten die LON 556-Exosomen eine leichte Begünstigung der Mannose-Rezeptor-Expression. (Abbildung 24 I, J, K und L).



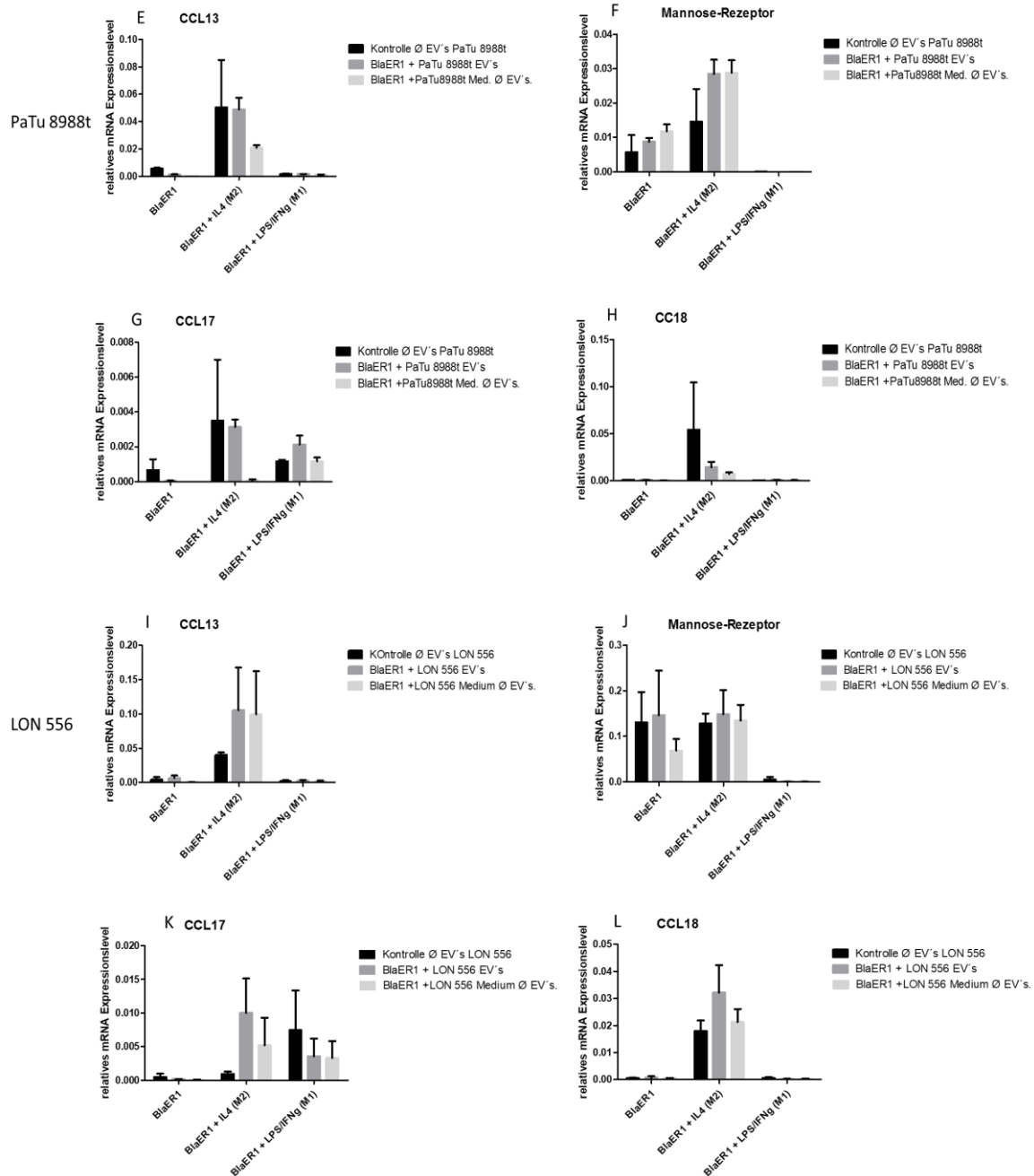
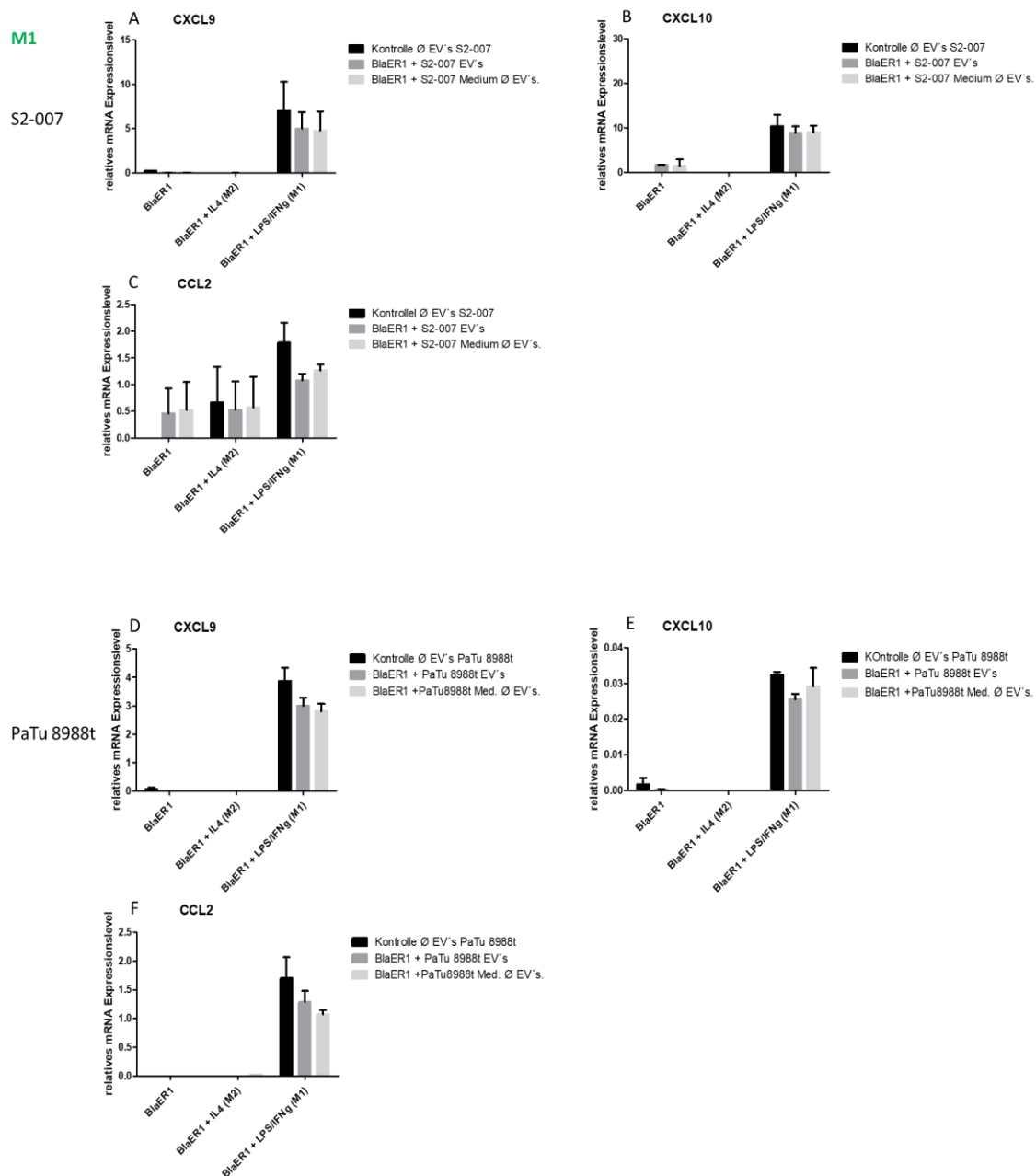


Abbildung 24: Exosomen aus Pankreaskarzinom-Zelllinien beeinflussen die relative Expression der tumorassoziierten M2-Marker in M2-polarisierten BlaER1-Zellen unterschiedlich

Von den polarisierten BlaER1-Zellen wurde 24 Stunden nach der Behandlung mit BlaER1-Zellen wurde 24 Stunden nach der Behandlung mit Pankreaskarzinomzell-Exosomen geerntet und per qRT-PCR die mRNA Expressionslevel der M2-Marker relativ zum Haushaltsgen RPLP0 analysiert. BlaER1-Behandlung mit S2-007 Exosomen M2-Marker (A) CCL13; (B) Mannose-Rezeptor; (C) CCL17 und (D) CCL18, (n=3); BlaER1-Behandlung mit PaTu 8988t Exosomen M2-Marker (E) CCL13; (F) Mannose-Rezeptor; (G) CCL17 und (H) CCL18, (n=3); BlaER1-Behandlung mit LON 556 Exosomen M2-Marker (I) CCL13; (J) Mannose-Rezeptor; (K) CCL17 und (L) CCL18, (n=5). Es wurden die Mittelwerte \pm Stabw. dargestellt. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt, bei dem die grau gekennzeichneten Versuchsgruppen mit der jeweiligen schwarzen Kontrollgruppe verglichen wurden. Nur signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet.

Wie bereits bei den THP1-Zellen, so zeigte weder die Behandlung mit Exosomen, noch mit exosoemenfreiem Medium einen positiven Einfluss auf den M1-Polarisationsstatus der BlaER1-Zellen. Die Expression der M1-Marker CXCL9, CXCL10 und CCL2 wiesen keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle auf, jedoch mit leichter Tendenz zu Herunterregulation (Abbildung 25 A bis I). Lediglich in unbehandelten BlaER-Zellen fiel auf, dass sowohl die Behandlung mit Exosomen als auch mit exosoemenfreiem Medium die Expression der Marker CCL2 deutlich und CXCL10 weniger stark begünstigte (Abbildung 25 A und C). Der Effekt in unbehandelten BlaER1-Zellen durch LON 556 Exosomen scheint eher als Artefakt (Abbildung 25 H).



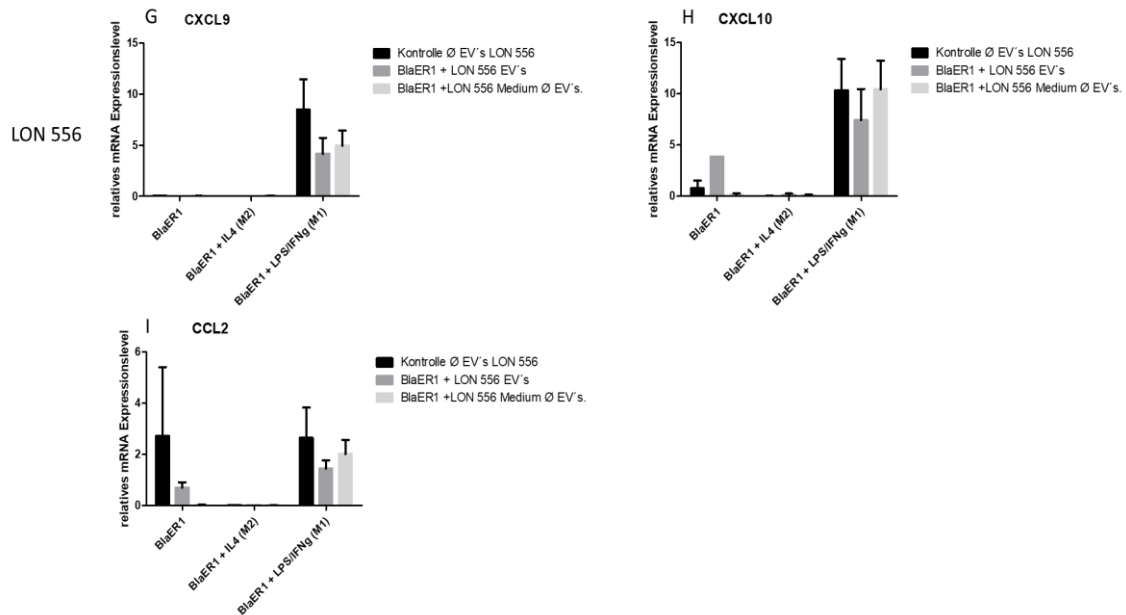


Abbildung 25: Exosomen aus Pankreaskarzinom-Zelllinien haben keinen Einfluss auf die relative Expression der M1-Marker in M1-polarisierten BlaER1-Zellen

BlaER1-Zellen wurde 24 Stunden nach der Behandlung mit Pankreaskarzinomzell-Exosomen geerntet und per qRT-PCR die mRNA Expressionslevel der M1-Marker relativ zum Haushaltsgen RPLP0 analysiert. BlaER1-Behandlung mit S2-007 Exosomen M1-Marker (A) CXCL9; (B) CXCL10 und (C) CCL2 (n=3); BlaER1-Behandlung mit PaTu 8988t Exosomen M1-Marker (D) CXCL9; (E) CXCL10 und (F) CCL2 (n=3); BlaER1-Behandlung mit LON 556 Exosomen M1-Marker (G) CXCL9; (H) CXCL10 und (I) CCL2, (n=5). Es wurden die Mittelwerte \pm Stabw. dargestellt. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt, bei dem die grau gekennzeichneten Versuchsgruppen mit der jeweiligen schwarzen Kontrollgruppe verglichen wurden. Nur signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Exosomen aus den verschiedenen Tumorzelllinien in unterschiedlicher Ausprägung einen Anstieg der relativen Expression von M2-Markern in THP1- und BlaER1-Zellen bewirkten. Beiden Zellsystemen gemein ist weiterhin, dass die Exosomenbehandlung aus den verschiedenen Tumorzelllinien den M1 Polarisationsstatus nicht positiv beeinflussen konnte. Es zeigte sich keine Veränderung bzw. eine schwache Reduktion der Expressionslevel der M1-Marker CXCL9, CXCL10 und CCL2 in den LPS/IFN γ induzierten Makrophagen.

3.7 Deep sequencing von extrazellulären Vesikeln bezüglich des RNA-Gehalts unter verschiedenen Kulturbedingungen

Nachdem sich nach der Tumorzell-Exosomenbehandlung eine deutliche Steigerung in der Expression des tumorassoziierten M2-Markers CCL13 in IL-4 induzierten THP1-Zellen gezeigt hatte, galt es als nächstes zu untersuchen, welche Substanzen tatsächlich in den extrazellulären Vesikeln verpackt werden und so zwischen Tumorzellen und Makrophagen unter Ko-Kulturbedingungen ausgetauscht werden können. Dazu wurden extrazelluläre Vesikel jeweils im doppelten Ansatz aus der Zelllinie S2-007 sowie aus THP1 + IL-4 (jeweils in Monokultur und unter Ko-Kulturbedingungen) isoliert (siehe Punkt 2.2.6). Für die Exosomen-Isolation wurden die Zellen jeweils in zwei 6-Well-Platten mit Inserts ausgesät. Anschließend wurde aus den isolierten Exosomen entsprechend RNA präpariert (siehe Punkt 2.2.2 b)) und von der Firma CeGaT sequenziert.

Der erhaltene Datensatz von der Firma CeGaT wurde mit Hilfe der Genomics Core Facility des ZTI (Dr. Marko Memberger) ausgewertet. Je Versuchsbedingung wurde eine Datei generiert, welche Information über alle detektierten RNA Sequenzen enthielt, die ausschließlich innerhalb der doppelbestimmten Probe je Versuchsbedingung aufgetreten waren. Von besonderem Interesse waren die FPKM-Werte (Fragmente Per Kilobase) aus den Versuchsbedingungen S2-007, THP1 + IL-4 und S2-007 + THP1 + IL-4. Der FPKM-Wert ist ein Normalisierungswert für die Sequenzierungstiefe und Genlänge. Er beschreibt die Anzahl der Reads normalisiert auf die jeweilige Länge des Transkripts. Die beiden FPKM-Werte wurden zunächst in jeder Datei summiert und absteigend aufgelistet. Anschließend wurden die summierten FPKM-Werte aus der Datei S2-007+ THP1 + IL-4 mit den FPKM-Werten aus den Dateien S2-007 und THP1 + IL-4 verglichen. So erhielt man eine Übersicht, welche Substanzen sowohl unter Ko-Kulturbedingung als auch in S2-007 und/oder THP1+ IL-4 und welche Substanzen ausschließlich unter Ko-Kulturbedingungen in Vesikel verpackt wurden.

Folgende Kandidaten für eine fortführende Analyse wurden daraus resultierend eingegrenzt:

IGFII-mRNA wurde in S2-007 sowohl unter Mono- als auch unter Ko-Kulturbedingungen verpackt. Da dieser Wachstumsfaktor bei der Tumorbildung immer wieder eine entscheidende Rolle spielt (Trajkovic-Arsic, Kalideris, and Siveke 2013), und IGFII die höchsten Werte der Summe der FPKM-Werte aus der Kandidatenliste aufwies, sollte der Einfluss der IGFII-mRNA in der Kommunikation zwischen

Tumorzellen und Makrophagen näher untersucht werden. Als weitere Kandidaten wurden die miRNAs miR 6724, miR 4497 und miR 5787 ausgewählt. Diese miRNAs wurden ausschließlich unter Ko-Kulturbedingungen in Vesikeln detektiert.

3.8 Knock down von IGFII in S2-007-Zellen hat keinen Einfluss auf M2 Polarisation von THP1-Zellen

Um zu überprüfen, ob der Wachstumsrezeptor IGFII eine Rolle von Seiten der Tumorzellen bei der Kommunikation von Tumorzellen und Makrophagen spielte, musste zunächst der knock down der mRNA des Wachstumsrezeptors in den S2-007-Zellen sichergestellt werden. Dies führte dazu, dass IGFII-mRNA während der Ko-Kultur nicht mehr in Extrazelluläre Vesikel der Tumorzellen verpackt werden konnte. Dafür wurden S2-007-Zellen mit drei verschiedenen siRNAs gegen IGFII transfizierte (siehe Punkt 2.2.7) und nach jeweils 24, 48 und 72 Stunden Transfektion von den Zellen RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben (2.2.2 a und c)) und die IGFII Expression mittels real-time PCR überprüft (siehe Punkt 2.2.2 e2)).

Im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte und Kontroll-siRNA-transfizierte S2-007-Zellen) induzierte si3 den stärksten Rückgang der IGFII-mRNA zwischen 24 und 72 Stunden, während si2 erst nach 72 Stunden eine deutliche Reduktion der IGFII-mRNA bewirkte und si1 nahezu gar keinen Effekt auf die IGFII-mRNA hatte (Abbildung 26 A). Der MTT-Assay, dass die siRNA-Kontrolle 72 Stunden nach der Transfektion kaum eine Auswirkung auf die Zellviabilität hatte. Dafür bewirkten alle siRNAs eine deutliche Reduktion der Zellviabilität der S2-007-Zellen (Abbildung 26 B).

Da si3 gegen IGFII die deutlichste Reduktion der IGFII-mRNA nach 72 Stunden bewirkte, wurde im folgenden Versuch si3 verwendet.

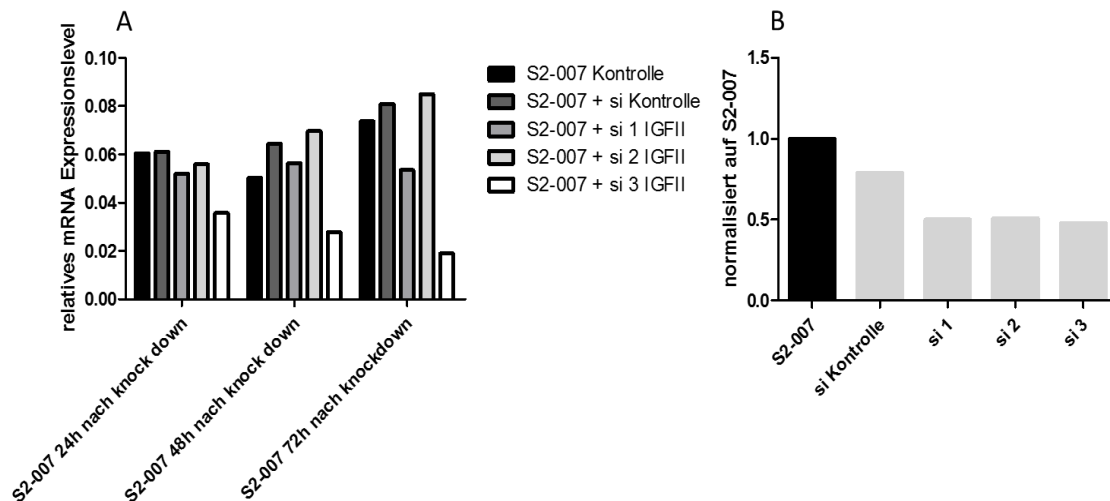


Abbildung 26: Testung knock down IGFII mRNA in S2-007-Zellen und die Auswirkung auf die Zellviabilität

(A) S2-007-Zellen wurden 24, 48 und 72 Stunden nach der IGFII Transfektion geerntet und per qRT-PCR die mRNA Expressionslevel von IGFII relativ zum Haushaltsgen RPLP0 analysiert. B) 72 Stunden nach IGFII siRNA-Transfektion wurde deren Auswirkung auf die Zellviabilität der S2-007-Zellen mittels eines MTT-Assays untersucht.

Im nachfolgenden Versuch wurden S2-007-Zellen mit si3 gegen IGFII und als Kontrolle mit siRNA-Kontrolle transfiziert. Nach vier Tagen wurden aus den Mediumüberständen der transfizierten Zellen die Exosomen isoliert und bereits polarisierte THP1-Zellen für 24 Stunden mit Exosomen behandelt. Nach der Inkubationszeit wurden die polarisierten THP1-Zellen bezüglich der M1 und M2-Marker Expression mittels real-time PCR untersucht (siehe Punkt 2.2.2 a, c und e1).

Die Behandlung mit Exosomen aus IGFII transfizierten S2-007-Zellen führt in IL-4 induzierten THP1-Zellen wie bei der Exosomenbehandlung aus nicht transfizierten S2-007-Zellen immer noch zu einem deutlichen Anstieg des CCL13 Expressionslevels im Vergleich zur Kontrolle. Auch die Behandlung mit Exosomen aus siRNA-Kontrolle transfizierten S2-007-Zellen begünstigte den M2 Status in IL-4 transfizierten THP1-Zellen, während die Behandlung mit exosomenfreiem Medium sowohl aus IGFII transfizierten als auch aus siRNA-Kontrolle transfizierten S2-007-Zellen keinen nennenswerten Einfluss auf den M2-Status der THP1-Zellen hatte (Abbildung 27 A). Die Behandlung mit Exosomen oder exosomenfreiem Medium aus transfizierten S2-007-Zellen zeigte keinen Einfluss auf den Polarisationsstatus von PMA induzierten THP1-Zellen. Lediglich die Exosomen aus siRNA-Kontrolle-transfizierten S2-007-Zellen führten zu einer erhöhten CCL13 Expression in LPS/IFN γ induzierten Zellen (Abbildung 27 A).

Die Behandlung der IL-4 induzierten THP1-Zellen mit Exosomen oder Medium ohne Exosomen aus transfizierten S2-007-Zellen zeigten im Gegenzug keinen eindeutigen Einfluss auf das Expressionslevel des Mannose-Rezeptors im Vergleich zur Kontrolle, wohingegen die Behandlung mit Exosomen aus nicht transfizierten S2-007-Zellen noch zu einer Reduktion des Mannose-Rezeptors in IL-4 induzierten THP1-Zellen geführt hatte. Dafür begünstigten sowohl Exosomen als auch Medium ohne Exosomen aus IGFII siRNA-transfizierten S2-007-Zellen den M2 Polarisationsstatus bezüglich der Mannose-Rezeptor Expression in PMA induzierten THP1-Zellen. Exosomen und Medium ohne Exosomen aus siRNA-Kontrolle-transfizierten Zellen zeigten nur einen geringen Einfluss auf die PMA induzierten THP1-Zellen, während in LPS/IFN γ induzierten Zellen weder Exosomen noch exosomenfreies Medium aus transfizierten S2-007-Zellen einen Einfluss auf den M1 Status zeigten (Abbildung 27 B). Im Gegensatz zu den M2-Markern zeigte die Behandlung mit Exosomen oder Medium ohne Exosomen aus IGFII und siRNA-Kontrolle-transfizierten S2-007-Zellen keinen begünstigenden Einfluss auf das Expressionslevel von CXCL9 in PMA oder IL-4 induzierten THP1-Zellen. Das traf im Allgemeinen auch für die LPS/IFN γ induzierten Zellen zu, mit dem Unterschied, dass die Behandlung mit Exosomen aus siRNA-Kontrolle-transfizierten S2-007-Zellen, wie beim Marker CCL13 bereits beobachtet, die Expression von CXCL9 deutlich begünstigte. Da es sich hierbei um kontrolltransfizierte Zellen handelt, muss dies als ein unspezifischer Effekt bzw. als Artefakt betrachtet werden (Abbildung 27 C).

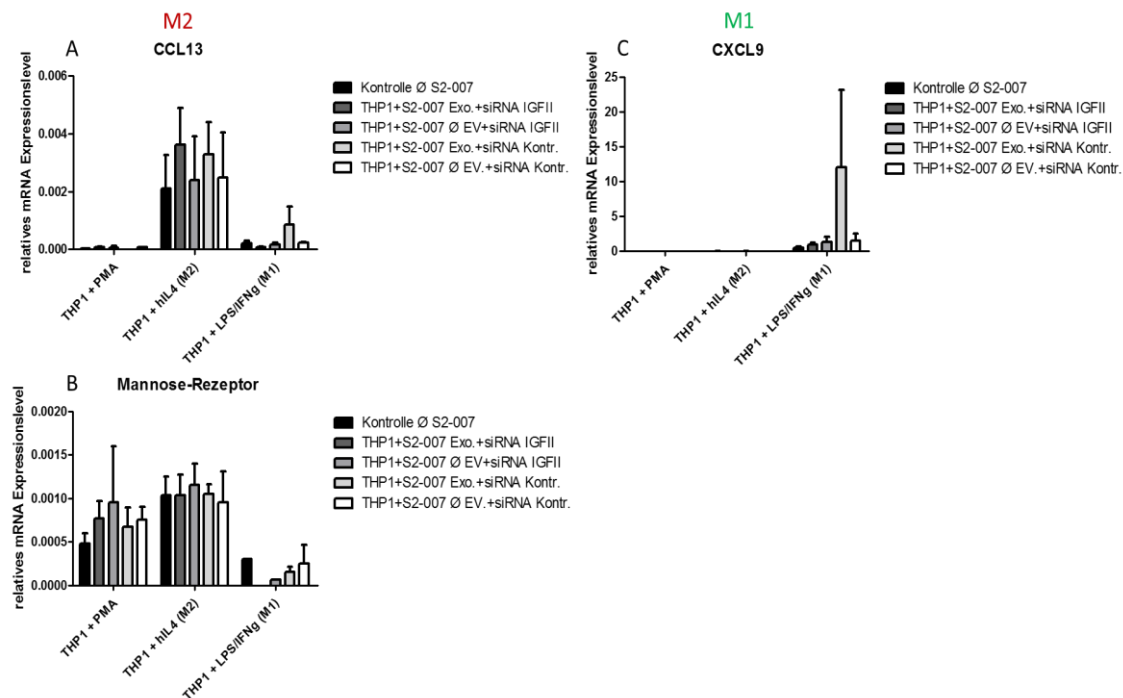


Abbildung 27: IGFII knock down hat keinen negativen Einfluss auf M2 Makrophagen

THP1-Zellen wurde 24 Stunden nach der Behandlung mit Pankreaskarzinomzell-Exosomen aus IGFII transfizierten S2-007-Zellen geerntet per qRT-PCR die mRNA Expressionslevel von IGFII relativ zum Haushaltsgen RPLP0 analysiert. THP1-Behandlung mit transfizierten S2-007 Exosomen gegen IGFII M2-Marker (A) CCL13 und (B) Mannose-Rezeptor. THP1-Behandlung mit transfizierten S2-007 Exosomen gegen IGFII M1-Marker (C) CXCL9. Es wurden die Mittelwerte \pm Stabw. (n=3) dargestellt. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt, bei dem die grau gekennzeichneten Versuchsgruppen mit der jeweiligen schwarzen Kontrollgruppe verglichen wurden. Nur signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet.

3.9 miRNAs 6734, 5787 und 4497 werden sowohl in S2-007-Zellen als auch M2 THP1-Zellen exprimiert und unter Ko-Kulturbedingungen in Vesikel verpackt

Im Gegensatz zu IGFII, bei dem klar war, dass dieser von S2-007-Zellen unter Mono- als auch unter Ko-Kultur in Vesikel verpackt wurde, wurden die miRNA-Kandidaten in den Sequenzier-Ansätzen ausschließlich unter Ko-Kulturbedingungen detektiert. Bevor der Einfluss der miRNAs auf die Ko-Kultur zwischen Makrophagen und Tumorzellen untersucht werden konnte, musste zunächst überprüft werden, ob Makrophagen und/oder Tumorzellen die miRNAs exprimieren und ob diese auch in den Exosomen nach Ko-Kultivierung wieder zu finden sind.

48 Stunden nach Monokultivierung und Ko-Kultivierung von S2-007-Zellen und M2-polarisierten THP1-Zellen wurde von den Zellen die RNA isoliert, in cDNA

umgeschrieben und die Expression der miRNAs 6724, 4497 und 5787 mittels real-time PCR analysiert (siehe Punkt 2.2.2 b, d und e2). Aus dem Medium der Ko-kultivierten Zellen wurden entsprechend Punkt 2.2.6 die Exosomen isoliert und hinsichtlich der miRNAs 6724, 4497 und 5787 untersucht.

Sowohl S2-007-Zellen als auch zu M2 Makrophagen polarisierte THP1-Zellen exprimieren alle drei miRNAs in einem ähnlichen Verhältnis. Auch unter Ko-Kulturbedingung exprimieren beide Zelllinien alle drei miRNAs. In den Vesikeln konnten ebenfalls nach der Ko-Kultur alle drei miRNAs detektiert werden, wobei miRNA 6724 deutlich schwächer als miRNA 4497 und miRNA 5787 detektiert werden konnte (Abbildung 28). Da beide Zelllinien alle drei miRNAs sowohl in Mono- als auch unter Ko-Kultur exprimieren, kann keine genaue Aussage darüber getroffen werden, welcher der beiden Zelllinien die miRNA nun unter Ko-Kultur in Exosomen verpackt.

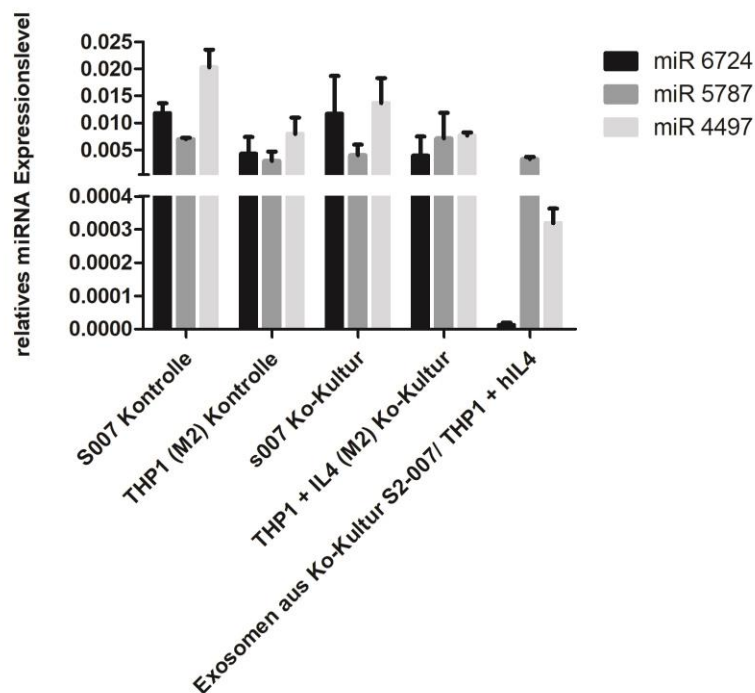


Abbildung 28: miRNAs werden in S2-007 und M2 THP1-Zellen exprimiert und unter Ko-Kulturbedingungen in Exosomen verpackt

(A) 72 Stunden nach der Ko-Kultur von S2-007-Zellen und M2-THP1-Zellen wurden aus dem Medium Exosomen isoliert. Sowohl aus den gewonnen Exosomen als auch aus den ko-kultivierten Zellen sowie aus S2-007 und M2-THP1 Einzelkulturen wurde die RNA isoliert und eine real-time PCR-Analyse durchgeführt. Die miRNA Expressionslevel der miRNAs 6724, 5787 und 4497 wurden relativ zum Haushaltsgen RPLP0 dargestellt. Es wurden die Mittelwerte \pm Stabw. (n=3) dargestellt.

4 Diskussion

Bei den meisten humanen Krebserkrankungen wird die Anwesenheit von tumorassoziierten Makrophagen mit einer schlechten Prognose für den Krankheitsverlauf assoziiert. Yoshikawa *et al.* konnten zeigen, dass die im Tumormilieu angesammelten M2 Makrophagen, signifikant mit einer zunehmenden Tumorgroße, und einer verschlechterten Prognose durch eine verstärkte Zunahme von Lebermetastasierung korrelierten (Ojalvo et al. 2009; Yoshikawa et al. 2012). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Makrophagen in der Lage sind, via Exosomen Proteine und miRNAs auf benachbarte Zellen zu übertragen. So konnten Yang *et al.* demonstrieren, dass Makrophagen durch die Übertragung exosomaler onkogener miRNAs die Invasivität von Brustkrebszellen regulieren können (Yang et al. 2011). Die Faktoren bzw. Mechanismen dahinter sind bis heute jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine Aufklärung dieser Mechanismen könnte die Entwicklung neuer Therapieansätze begünstigen und eine Inhibition der Tumorentwicklung ermöglichen.

4.1 Polarisation von Makrophagen

Mantovani *et al.* haben bereits 2004 beschrieben, dass die Polarisation von Makrophagen in Richtung M1/M2 durch Zuhilfenahme bestimmter Zytokine oder LPS möglich ist (Mantovani et al. 2004). In der hier vorliegenden Dissertation wurde die Polarisation in primären humanen Makrophagen und humanen Makrophagen-Zelllinien getestet. Wie bei Mantovani *et al.* und Martinez *et al.* führten eine Stimulation mit LPS/IFN γ sowohl in humanen primären Monozyten als auch in den Zelllinien THP1 und BlaER1 zu einer erhöhten mRNA Expression der M1-Marker CXCL9, CXCL10 und CCL2. Kontrovers beschrieben ist bei Mantovani eine erhöhte mRNA Expression von CCL2 nach einer IL-4 und IL13 Stimulation. Dies konnte weder in den primären humanen Makrophagen noch bei den Zelllinien bestätigt werden. Des weiteren konnten Mantovani und Martinez noch weitere M1-Marker wie beispielsweise CCL5, IL6, oder IL12 nachweisen (Mantovani et al. 2004; Martinez et al. 2006).

Wie bei Mantovani *et al.* führte die Stimulation mit IL-4 in primären humanen Monozyten zu einer erhöhten Expression der mRNAs für CCL17, CCL18 und des

Mannose-Rezeptors. Auch der CCL13 Marker wies nach IL-4 Stimulation in primären humanen Monozyten wie bei Martinez *et al.* eine erhöhte mRNA-Expression auf. Mantovani *et al.* beschrieben auch CCL22 als M2-Marker, jedoch konnte in dieser Arbeit CCL22 als M2-Marker weder in primären humanen Monozyten noch in den Zelllinien THP1/BlaER1 bestätigt werden (Mantovani et al. 2004; Martinez et al. 2006). Dies könnte daran liegen, dass in der Literatur meist IL-4 und IL13 in Kombination zur M2 Polarisation genutzt werden. Jedoch wies die Kombination von IL-4 mit IL13 keinen Unterschied zur alleinigen Stimulation mit IL-4 auf, weshalb in dieser Arbeit IL-4 als alleinstehender Stimulus beibehalten wurde. In der Zelllinie THP1 zeigte sich durch IL-4-Stimulation ebenfalls eine erhöhte Expression in den M2-Markern CCL13, CCL17 und des Mannose-Rezeptors. CCL18 war als M2-Marker für diese Zelllinie nicht geeignet, da dieser in LPS/IFN γ stimulierten Zellen erhöht war. In den BlaER1-Zellen zeigten sich nach IL-4-Stimulation hingegen CCL13, CCL17, CCL18 und der Mannose-Rezeptor als geeignete M2-Marker.

In dieser Arbeit sollte getestet werden in wiefern die Ergebnisse aus den Zelllinien mit denen aus humanen Primärkulturen übereinstimmen. Bis auf den CCL22 Marker, der für keines der beiden Systeme geeignet war, und der CCL18 Marker, der nur in THP1-Zellen als nicht verlässlich eingestuft wurde, stimmten alle getesteten M1- und M2-Marker in beiden Systemen überein. Obwohl die primären Monozyten eher humane Zellen *in vivo* widerspiegeln, kann mit jedem buffy coat nur ein Versuch durchgeführt werden, was die Reproduzierbarkeit der Versuche und auch die Möglichkeit diese unter gleichen Bedingungen durchzuführen erheblich erschwert. Zelllinien hingegen zeigen einen konstanteren Charakter und können in Dauerkulturen gehalten und für mehrere Versuche verwendet werden. Dennoch können sich auch Zelllinien in Dauerkulturen verändern.

Die Komplexität der Polarisation von Makrophagen darf nicht unterschätzt werden. So gibt es kontroverse Diskussionen über die Definition bzw. Beschreibung der Aktivierung und Polarisation von Makrophagen in der Literatur. Murray *et al.* beschreiben Standards für eine einheitliche Definition der Makrophagen-Aktivierung und -Polarisation sowie der Aktivatoren und Marker. Beispielsweise soll keine einfache M1/M2 Beschreibung mehr verwendet, sondern die Makrophagen entsprechend ihrer Stimuli bezeichnet werden (M(IL-4), M(IL-10), M(LPS) usw.) (Murray et al. 2015). Des Weiteren muss auch beachtet werden, dass bei der Makrophagenpolarisation im menschlichen Körper und in humanen Tumoren nie M1- oder M2 Makrophagen alleine

vorkommen. Vielmehr ist es so, dass ein und dieselbe Zelle gleichzeitig M1 und M2 Eigenschaften haben kann und somit immer ein Mix an verschiedenen Phänotypen im Tumormilieu vorherrscht. Diese verschiedenen Phänotypen können z.B. durch Anwesenheit von Sauerstoff oder die Aktivierung des *hypoxia-inducible factors* (HIF)-Signalweges beeinflusst werden (Mantovani et al. 2018). In *in vitro* Versuchen hingegen muss eine gezielte Polarisation der Monozyten in den Zelllinien durchgeführt werden, um beispielsweise Grundlagenforschung bezüglich der Kommunikation zwischen Makrophagen und Tumorzellen durchführen zu können. Es steht außer Zweifel, dass Makrophagen und auch Tumorzellen noch mit anderen Zellen des Stromas in Kontakt stehen. Um aber Mechanismen aufklären zu können oder Biomarker zu identifizieren, muss eine Entzerrung und auch Idealisierung des Systems stattfinden. Dabei muss immer beachtet werden, dass die Tumorzelllinien weder den gesamten Tumor widerspiegeln können noch die Makrophagen-Zelllinien sich wie *in vivo* verhalten. Aber dennoch können durch die Zelllinien die exprimierten Moleküle einzeln betrachtet werden, die helfen die Komplexität besser zu verstehen und welche hinterher in das Gesamtkonzept eingeordnet werden können.

4.2 Der Einfluss von Ko-Kulturen und konditioniertem Medium von Tumorzellen auf die Makrophagenpolarisation und von Makrophagen auf die Tumorzellen

Um herauszufinden welchen Einfluss Tumorzellen auf die Polarisation von Makrophagen ausüben und ob Makrophagen ihrerseits Tumorzellen in ihrem Wachstum beeinflussen können, wurden in dieser Arbeit Ko-Kulturversuche mit Pankreaskarzinom-Zelllinien und polarisierten Makrophagen-Zelllinien THP1/BlaER1 durchgeführt.

Es konnte eindeutig ein Einfluss von polarisierten Makrophagen auf die Tumorzellen beobachtet werden. So zeigten besonders S2-007-Zellen mit beiden M1 Zellsystemen und jeweils etwas abgeschwächt LON 560-Zellen in Anwesenheit von M1 polarisierten THP1-Zellen und LON 556-Zellen unter M1 BlaER1-Zellen ein signifikant reduziertes Wachstumsverhalten. Wenn auch nicht statistisch signifikant, aber entsprechend der Erwartung, dass M2 Makrophagen das Wachstum von Tumorzellen begünstigen, zeigten S2-007- und LON 556-Zellen 72 Stunden nach Ko-Kultivierung unter Einfluss von M2-polarisierten THP1-/BlaER1-Zellen und teilweise auch unter PMA bzw.

transdifferenzierten Makrophagen einen leichten Trend zu einer verbesserten Zellviabilität.

Interessanterweise ergab die Behandlung der Tumorzellen mit konditioniertem Medium von polarisierten Makrophagen in den MTT Analysen Ergebnisse, die der erwarteten Richtung aus der Literatur viel eher entsprachen. Das zeigt, dass die wachstumssupprimierenden Effekte von den M1-polarisierten Makrophagen auf die S2-007- bzw. LON 556-Zellen und proliferationsfördernden Effekte von M2-polarisierten Makrophagen auf S2-007-, PaTu 8988t und LON 556-Zellen durch Zell-sezernierte Moleküle bewirkt werden. Der Grund, weshalb unter Ko-Kultur scheinbar nicht die erwarteten Effekte in einem deutlichen Ausmaß detektiert werden konnten, könnte damit zusammenhängen, dass es während der Ko-Kultur zu Kommunikation zwischen Tumorzellen und Makrophagen kommt, die einen spezifischen Effekt auslösen, der aber durch andere zusätzlichen Faktoren überlagert wird. Erwähnenswert ist hier auch, dass die Lebensdauer von polarisierten Makrophagen in den hier beschriebenen Versuchen begrenzt war; So führte die Behandlung von THP1-/BlaER1-Zellen mit konditioniertem Tumorzell-Medium oder Exosomen über den Zeitraum der Ko-Kultur von 72 Stunden dazu, dass die Makrophagen ihre nach der PMA Induktion bzw. der Transdifferenzierung erworbene Eigenschaft semi adherent an der Transwell-Membran zu haften verloren und im Medium schwammen. Dies hatte zur Folge, dass nicht genügend Zellen für eine RNA-Isolation geerntet werden konnten. Daraufhin wurden die Makrophagen für einen Zeitraum von maximal 24 Stunden mit konditioniertem Tumorzell-Medium oder Exosomen inkubiert. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass nicht nur tumorassoziierte Makrophagen allein für die Beschleunigung des Tumorwachstums verantwortlich sind, sondern weitere Komponenten der extrazellulären Matrix wie beispielsweise Fibroblasten im System fehlen, die erst im Zusammenspiel das Tumorwachstum unterstützen.

Liu *et al.* und Kuwada *et al.* haben Ko-Kultur-Versuche mit Pankreaskarzinom-Zelllinien und M2-polarisierten Makrophagen durchgeführt und dabei den Einfluss der Makrophagen auf die Tumorzellen untersucht. Liu *et al.* ko-kultivierte die Pankreas-Zelllinien BxPC-3 und Panc-1 mit M2-polarisierten murinen Makrophagen RAW 264.7. Im Unterschied zu dem in dieser Arbeit etablierten Protokoll, erfolgte die IL-4-Induktion der murinen Makrophagen vor der Ko-Kultur für 24 Stunden. Hier konnte zum einen beschrieben werden, dass die Tumorzellen unter Ko-Kultur im Vergleich zur Monokultur spindelförmige Morphologien ausbildeten. Diese Beobachtung konnte

während der Ko-Kulturen und unter der Verwendung der S2-007-, PaTu 8988t- und LON 556-Zellen jedoch nicht bestätigt werden. Zusätzlich konnten Liu *et al.* zeitgen, dass M2 Makrophagen 24 Stunden nach Ko-Kultivierung in den Tumorzellen die mRNA-Expression von mesenchymalen Markern (Vimentin und snail) induzierten, während die mRNA-Expression von epithelialen Markern (E-Cadherin) reduzierten wurde. Darüber hinaus konnte auch eine signifikante Zunahme der Proliferation und Migration bei den Tumorzellen 24 Stunden nach Ko-Kultur mit M2 Makrophagen sowohl in Panc1 als auch in BxPC-3-Zellen detektiert werden (Liu et al. 2013). Eine Tendenz zu einer Verbesserten Zellviabilität unter Einfluss von M2-Makrophagen konnte nach 72 Stunden Ko-Kultur, wenn auch mit anderen Tumorzelllinien, auch in den hier erhobenen Daten beobachtet werden. Auch Kuwada *et al.* detektierte nach 48 Stunden Ko-Kultur von BxPC-3-/Panc-1-Zellen mit M2-polarisierten THP1-Zellen die Ausbildung von spindelförmigen Morphologien der Tumorzellen. Wie bei Liu *et al.* erfolgte eine Zunahme der mRNA-Expression der mesenchymalen Marker (Vimentin und α -SMA) und eine Reduktion der mRNA-Expression des epithelialen Markers E-Cadherin. Auch hier konnte eine signifikante Zunahme der Migration und zusätzlich der Invasion der Tumorzelllinien unter Ko-Kulturbedingungen mit Makrophagen gezeigt werden. (Kuwada et al. 2018). Die beiden Veröffentlichungen zeigen, dass sowohl Maus als auch humane M2-polarisierte Makrophagen-Zelllinien denselben Effekt auf die verwendeten Tumor-Zelllinien BxPC-3-/Panc-1 haben. Da der Aspekt der mesenchymalen und epithelialen Marker nicht im Fokus dieser Arbeit stand, kann dies mit den hier erhobenen Daten nicht direkt verglichen werden.

Entsprechend der Erwartung, dass Tumorzellen die Polarisation von M1 Makrophagen unterdrücken, konnte nach 72 Stunden Ko-Kultur in THP1 und BlaER1 Makrophagen eine sehr stark verminderte Expression der M1-Marker CXCL10 und ein etwas geringere Reduktion der Marker CXCL9 und CCL2 im Vergleich zu den Kontrollen detektiert werden. Entgegen der Erwartung erfolgte unter Ko-Kultur keine Überexpression der M2-Marker CCL13, CCL17, CCL18 oder des Mannose-Rezeptors. Die Expression der M2-Marker war unter Ko-Kultur mit verschiedenen Tumor-Zelllinien auch sehr stark vermindert. Am stabilsten zeigte sich der M2-Status der THP1- und BlaER1-Zellen unter Ko-Kultur mit der primären Pankreas-Zelllinie LON 556. Zudem zeigten auch die in eine Makrophagenvorstufe stimulierten THP1- und BlaER1-Zellen keine Überexpression der M1- oder M2-Marker. Entweder war die Menge an, unter den gewählten Ko-Kulturbedingungen, sezernierten Molekülen bzw.

Vesikeln zu gering, um eine Überexpression der M2-Marker zu erreichen, oder das Ko-Kultursystem ist zu eindimensional, sodass vermutet werden könnte, dass die Tumorzellen nicht allein für die Ausbildung von TAMs im Tumormilieu verantwortlich sind. So zeigten Kuen *et al.*, dass Tumorzelllinien (PaTu-8902, BxPc3, HPAC und MiaPaCa-2) die mit *medical research council cell strain 5* (MRC-5) *foetal lung* Fibroblasten bis zu einer Spheroïd 3D Kultur ko-kultiviert wurden, die M2 ähnliche Polarisation von eingewanderten Monozyten begünstigten. Die Spheroïd polarisierten Monozyten exprimierten wenig CD86, *human leukocyte antigene* (HLA)-DR und CD40, dafür aber viel CD163 and Arginase-1 (Kuen et al. 2017).

Überraschenderweise führte die Behandlung von polarisierten THP1-Zellen mit konditioniertem Medium von S2-007-/PaTu 8988t-Zellen zu einer deutlich stabileren Expression des M2-Markers CCL13 im Vergleich zur Ko-Kultur. Der Mannose-Rezeptor zeigte nach wie vor eine verminderte Expression im Vergleich zur Kontrolle. Dies unterstützt jedoch die Vermutung, dass es sich eher um ein Exosomen- bzw. Molekül-sezerniert gerichteten Mechanismus handelt, bei dem die Tumorzellen in Abhängigkeit der Zellzahl oder Kultivierungsdauer während der Ko-Kultur zu wenig Exosomen bzw. Moleküle sezernieren konnten, um eine Überexpression der M2-Marker zu erreichen.

Chen *et al.* konnten zeigen, dass THP1-Monozyten 24 Stunden nach der Inkubation mit konditioniertem Medium von Pankreaskarzinom-Zelllinien BxPC-3-/Panc-1 einerseits am Zellkulturboden des Zellkulturgefäßes adherent wurden und teilweise sogar Pseudopodien ausbildeten. Des Weiteren konnte detektiert werden, dass die THP1-Zellen signifikant verstärkt die M2-Marker CD163 und CD204 exprimierten, während der M1-Marker HLA-DR keine signifikanten Veränderungen im Bezug zur Kontrolle aufwies (S. jie Chen et al. 2018). Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich PMA induzierte und M1/M2 polarisierte THP1-Zellen mit konditioniertem Pankreaskarzinomzell-Medium für 24 Stunden behandelt wurden, können die Daten mit denen von Chen *et al.* nicht direkt verglichen werden.

Des Weiteren muss beachtet werden, dass die Polarisation von Makrophagen einer Dynamik unterliegt, bei der die Genexpression polarisationsspezifischer Marker in Abhängigkeit der Zeit erheblichen Schwankungen unterliegen kann. Außerdem kann die Polarisation von Makrophagen durch das Hinzufügen von weiteren Zytokinen durchaus wieder verändert werden. Dies beschreiben auch Antonios *et al.* in ihrer Studie (Antonios et al. 2013).

4.3 Charakterisierung der Isolation von extrazellulären Vesikeln aus Zellen

Nach wie vor gibt es immer noch keine standardisierte Isolationsmethode von Exosomen, für die klinische Anwendung (Simpson et al. 2009). Für die Isolation von Exosomen stehen verschiedene Techniken wie die Ultrazentrifugation, Dichtegradientenzentrifugation, Ultrafiltration, Exosom-Isolation durch Präzipitation, Exosom-Isolation durch beschichtete magnetische Beads oder mit Hilfe von mikrofluidisch basierten Techniken (ExoChip) zur Verfügung, (Li et al. 2017). Welche der Methoden dabei am besten geeignet ist, ist jedoch immer noch umstritten (Théry et al. 2006). Die Methode der beschichteten magnetischen Beads wurde hier nicht in die engere Wahl genommen, da mit dieser Methode nicht alle im Medium befindlichen Vesikel isoliert werden können. Die Ultrazentrifugation ist zwar ein recht zeitaufwendiges Verfahren, aber im Vergleich zu einigen Kit-Systemen, die eine deutliche Zeitersparnis versprechen (z.B. Exospin-Kit), immer noch die am häufigsten angewandte Methode. Zu Beginn dieser Arbeit wurde zur Isolation von Exosomen auch der Exospin-Kit getestet. Dieser lieferte aber im Vergleich zur Ultrazentrifugation keine überzeugenden Ergebnisse (Exospin-Kit Daten nicht gezeigt). Daher wurde in dieser Arbeit die Methode der Ultrazentrifugation zur Isolation extrazellulärer Vesikel beibehalten.

Anhand der Methoden des Western Blots, der Elektronenmikroskopie und der NTA-Methode konnte charakterisiert werden, dass isolierte Membranvesikel Oberflächenmarker wie CD63 oder Flotillin exprimieren, eine typisch napfartige Form sowie eine bestimmte Partikelmenge je Zelllinie und eine durchschnittliche Größe zwischen 36 und 200 nm aufweisen. Die hier ermittelten durchschnittlichen Größen von 36 bis 200 nm mittels NTA-Analyse weichen etwas von den in der Literatur angegebenen 30 bis 100 nm ab. Nach Colombo *et al.* können durch eine hochtourige Zentrifugation aus konditioniertem Medium von Tumorzelllinien isolierte Exosomen durch deren Heterogenität durchaus Größen im Bereich zwischen 30 und 150 nm aufweisen (Colombo, Raposo, and Théry 2014).

Obwohl die Ultrazentrifugation nach wie vor den Goldstandard zur Exosomen-Isolation darstellt, birgt die Methode Vor- und Nachteile. Auf Grund der Heterogenität von Exosomen und der beachtlichen Überlappung der Größe von extrazellulären Vesikeln, sind isolierte Exosomen nach Ultrazentrifugation häufig mit Proteinen oder Lipoproteinen kontaminiert. Durch die hohen verwendeten Zentrifugalkräfte werden

einige der Exosomen zerstört, was mit einem Ausbeuteverlust einhergeht und sich negativ auf nachfolgende Analysemethoden auswirken kann. (Jeppesen et al. 2014). Ein großer Vorteil ist jedoch, dass mit der Ultrazentrifugation sehr hohe Mengen an Probenvolumina aufgereinigt und vergleichsweise hohe Ausbeuten erzielt werden können (Li et al. 2017). So lange es keine speziellen Isolations- und Charakterisierungsmethoden gibt, welche eine sichere Unterscheidung zwischen spezifischen und gemeinsam funktionalen Eigenschaften der verschiedenen extrazellulären Vesikel-Subtypen ermöglichen, wird es weiterhin schwierig bleiben eigene Daten bezüglich der Funktionalität von Exosomen mit denen aus der teilweise widersprüchlichen Literatur in Verbindung zu bringen. Eine Unterscheidung auf Basis der wesentlichen Eigenschaften wie Größe, Struktur, Dichte oder Proteinzusammensetzung, wie sie auch in dieser Arbeit angewandt wurde, wird in Zukunft nicht mehr ausreichend sein. Demnach besteht immer noch die Notwendigkeit nach der Identifizierung spezieller Marker auch ein besseres Verständnis des Mechanismus der Biogenese und Sekretion von extrazellulären Vesikeln zu erhalten (Kowal et al. 2016).

4.4 Exosomen aus Pankreaskarzinom-Zelllinien beeinflussen die Polarisation von Makrophagen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine ausreichende Anzahl an Tumorzell-sezernierten Exosomen die Polarisation von Makrophagen beeinflussen kann.

So wurde bei M2-polarisierten THP1-Zellen 24 Stunden nach Tumorzell-Exosomen-Behandlung überwiegend die Expression des CCL13 Markers stimuliert. Die Polarisation der BlaER1-Zellen wurde dagegen unterschiedlich durch Tumorzell-Exosomen beeinflusst. So exprimierten M2 BlaER1-Zellen nach S2-007 Exosomen-Behandlung verstärkt die Marker Mannose-Rezeptor und CCL18. Nach Exosomen-Behandlung der LON 556 Zellen dagegen wurden verstärkt die Marker CCL13, CCL17 und CCL18 in M2 BlaER1-Zellen exprimiert. Am unempfindlichsten zeigten sich M2 BlaER1-Zellen nach der Exosomen-Behandlung durch PaTu 8988T-Zellen. Hier reagierte nur der Mannose-Rezeptor mit einer erhöhten Expression. Dies zeigt, dass Exosomen aus Tumorzellen am ehesten den erwarteten Effekt den M2 Phänotyp zu unterstützen erfüllen. Verglichen mit der indirekten Ko-Kultur oder konditioniertem Medium, bei denen andere Komponenten diese Interaktion inhibieren können, handelt es sich bei Exosomen um eine ausreichend reine Population, die spezifisch die Makrophagenpolarisation beeinflussen kann. Allerdings muss auch erwähnt werden,

dass die Exosomen der unterschiedlichen Tumorzelllinien keine eindeutige „denovo-Polarisation“ der PMA induzierten THP1-Zellen bzw. der transdifferenzierten BlaER1-Zellen hin zu einer M2-Polarisation bewirkten. So zeigten die hier erhobenen Daten 24 Stunden nach Exosomen-Behandlung von Panc1-, PaTu 8988t- und LON 556-Zellen eine leicht erhöhte Expression des CCL13 Markers in PMA induzierten THP1-Zellen, wobei der Mannose-Rezeptor stets vermindert erschien. In transdifferenzierten BlaER1-Zellen zeigten sich dagegen 24 Stunden nach Exosomen-Behandlung von S2-007-Zellen eine leicht verstärkte Expression der Marker CCL13 und CCL17, während nach der Exosomen-Behandlung von PaTu 8988t-/LON 556-Zellen eher eine leicht verstärkte Expression des Mannose-Rezeptors detektiert werden konnte. Auch bei Linton *et al.* konnten keine einheitliche durch Exosomen-Behandlung bewirkte M2-Polarisation in PMA induzierten THP1-Zellen gezeigt werden. Linton *et al.* konnten nachweisen, dass PMA stimulierte THP1-Zellen 72 Stunden nach Exosomen-Behandlung (30 µg Exosomen-Protein) von AsPC-1-Zellen signifikant mehr die M2-Marker CD163 und CD206 exprimierten. Exosomen von Panc1-Zellen dagegen bewirkten eine signifikant erhöhte Expression von CD163 aber nicht von CD206. Dabei wies die Kontrolle der M2-polarisierten THP1-Zellen im Vergleich zu den mit Exosomen behandelten Zellen, eine deutlich stärkere Expression der beiden Marker auf (Linton et al. 2018). Nach Exosomen-Behandlung der unterschiedlichen Tumorzelllinien erfolgte auch keine „denovo-Polarisation“ der PMA induzierten THP1-Zellen bzw. der transdifferenzierten BlaER1-Zellen hin zu einer M1-Polarisation.

Dadurch, dass die unterschiedlichen Tumorzell-Exosomen die M2-Phänotyp zugeordnete Marker CCL13, CCL17, CCL18 und Mannose-Rezeptor in THP1- und BlaER1-Zellen auch unterschiedlich stark regulierten, kann dennoch keine eindeutige M2-Phänotypzuweisung durch Tumorzell-Exosomen vorgenommen werden. Dennoch lohnt es sich die Funktion der durch Exosomen-Behandlung erfolgte Überexpression der Marker CCL13, CCL17 und CCL18 in Makrophagen näher zu untersuchen.

Die Rolle von CCL13 in Tumoren ist so gut wie nicht untersucht. CCL13 gehört zur CC Chemokin Familie, auch bekannt unter dem Namen *monocyte chemoattractant proteins* (MCPs). MCP-4 bindet an die Rezeptoren CCR 1-3 und vermittelt die chemische Anlockung von Monozyten, T-Zellen und unreifen dendritischen Zellen (Mendez-Enriquez and García-Zepeda 2013). Moffitt *et al.* konnten zeigen, dass aktiviertes Tumorstroma durch die Expression verschiedenster Gene wie Integrin Untereinheit Alpha M oder die Chemokinliganden CCL13 und CCL18, welche hauptsächlich mit

Makrophagen assoziiert werden, charakterisiert ist (Moffitt et al. 2015). CCRs werden auch von Muskelzellen und Epithelzellen exprimiert, bei denen eine CCL13-Bindung deren Aktivierung und Proliferation induziert. Hauptsächlich ist CCL13 jedoch als Biomarker bei Asthma bekannt (Kalayci et al. 2004; Mendez-Enriquez and García-Zepeda 2013). Welche Funktion speziell die Überexpression von CCL13 in THP1-Zellen oder BlaER1-Zellen durch Tumorzell-Exosomen für die Makrophagen hat und wie sich das auf Pankreastumore auswirkt kann mit Hilfe der Literatur hier nicht beantwortet werden und muss in Zukunft noch näher untersucht werden.

Auch die Rolle von CCL17 im Speziellen in Pankreastumoren ist so gut wie nicht untersucht. In vielen Tumoren sezernieren sowohl Tumorzellen als auch tumorassoziierte Makrophagen und dendritische Zellen die Chemokine CCL17 und CCL22, welche hauptsächlich regulatorische T-Zellen über CCR4 anlocken (Shevchenko et al. 2013). Protti *et al.* haben *in vivo* nachgewiesen, dass CCL17 von tumorassoziierten Stroma-Zellen exprimiert wird, während CCL22 von Tumor- und Stroma-Zellen sezerniert wird (Protti and De Monte 2012). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CCL17 nicht nur die Interaktion zwischen T-Zellen und dendritischen Zellen vermittelt, sondern auch die Auswanderung von Langerhans Zellen (dendritische Zellen der Haut) aus der Haut initiiert, die Homöostase von regulatorischen T-Zellen kontrolliert und an der Zytokin-abhängigen Th17-Differenzierung beteiligt ist (Globisch et al. 2014). Es ist auch bekannt, dass Th2 Lymphozyten in gehäufte Anzahl im für Pankreastumoren charakteristischen Stroma vorkommen. So konnte gezeigt werden, dass aus Biopsien, isolierten Zellen und Kurzzeitkulturen mit primären Zellen die malignen Zellen Zytokine sezernierten, welche Fibroblasten zur Produktion von *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) stimulierten. TSLP aktivierte im Tumor ansässige dendritische Zellen, die in die Lymphknoten einwandern und CD4⁺ T-Zellen mit einem Th2 Phenotyp aktivieren. Die Th2 anlockenden Chemokine CCL17 und CCL22 rekrutieren diese CD4⁺ Zellen zum Tumor, wo sie einen tumorfördernden Einfluss ausüben (De Monte et al. 2011). Katakura *et al.* konnten bereits 2004 nachweisen, dass von M2 Makrophagen sezerniertes Chemokin CCL17 und Interleukin IL10 die M1-Differenzierung von Makrophagen inhibierten (Katakura et al. 2004).

Ob speziell die Überexpression von CCL17 in BlaER1-Zellen durch Tumorzell-Exosomen die M1-Differenzierung von Makrophagen inhibieren auch für BlaER1-Zellen zutrifft und wie sich dies weiter auf Pankreastumore auswirkt, muss in Zukunft noch näher untersucht werden.

Wesentlich besser ist die Rolle von CCL18 in Pankreastumoren untersucht und beschrieben worden.

In der Literatur ist die Expression von CCL18 in Monozyten und Makrophagen gegensätzlich beschrieben. So wurde einerseits beschrieben, dass CCL18 in hohen Konzentrationen in LPS stimulierten Makrophagen exprimiert wird, während andere Quellen zeigten, dass durch IL-4, IL-13 und IL-10 CCL18 in Makrophagen verstärkt exprimiert wird (Schutyser, Richmond, and Van Damme 2005). Dies spiegelte sich auch unter den hier erhobenen Daten wider. Bei den Polarisationsversuchen der Makrophagen aus den Zelllinien THP1 und BlaER1, exprimierten LPS stimulierte THP1-Zellen verstärkt CCL18, während bei BlaER1-Zellen die CCL18 Expression nur durch IL-4 stimuliert wurde.

Einige Veröffentlichungen legen nahe, dass CCL18 einen direkten Einfluss auf Tumorzellen ausüben kann. Dies beinhaltet die Begünstigung der zellulären Invasion, der Metastasierung und *epithelial-mesenchymal transition* (EMT) bei Brustkrebs, Pankreastumoren, Eierstockkrebs und Prostatakarzinomen. In einigen Tumoren, wie bei Brustkrebs, exprimieren hauptsächlich TMAs CCL18, während Eierstockkrebszellen CCL18 selbst überexprimieren (Nagarsheth, Wicha, and Zou 2017). So konnten auch Schraufstatter *et al.* zeigen, dass primäre Makrophagen-like Zellen nach IL-4 Stimulation eine verstärkte CCL18 Expression aufwiesen (Schraufstatter *et al.* 2011). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Epithelzellen und mesenchymale Makrophagen in Pankreastumoren vermehrt CCL18 exprimierten. Diese Expression korrelierte mit der Tumorentwicklung und der durchschnittlichen Überlebensrate der Patienten. CCL18 im Serum gilt daher als potentieller Biomarker für die Diagnose- und Prognosestellung bei Pankreaskarzinom-Patienten (Meng *et al.* 2015). Die bis her veröffentlichte Literatur beweist, dass CCL18 eine Rolle bei der Tumorentwicklung von Pankreastumoren spielen. Doch die hoch aktuelle Studie von Ye *et al.* liefert erste Hinweise auf die Funktion der CCL18 Überexpression in TAMs und deren Auswirkung auf Pankreastumore. Ye *et al.* konnten zeigen, dass CCL18 positive TAMs eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von malignen Pankreastumoren spielen. So bindet CCL18 sekretiert von M2 TAMs an den *phosphatidylinositol transfer protein membrane-associated 3* (PITPNM3)-Rezeptor auf Pankreaszellen. Daruf hin erfolgt über die Aktivierung des *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) Signaltransduktion Weges die verstärkte Expression von *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) in Pankreaszellen (Ye *et al.* 2018). In wie weit dieser

Mechanismus auch für in dieser Arbeit verwendeten BlaER1-Zellen und Pankreaskarzinom-Zelllinien zutrifft, muss erst noch weiter untersucht werden.

In einigen Fällen beeinflusste auch Exosomen-freies Medium die Polarisation der M2 Makrophagen. Dies mag daran liegen, dass nicht nur Exosomen sondern auch freie Tumorzell-sezernierte Moleküle, welche nicht durch die Ultrazentrifugation abgetrennt wurden, die Polarisation von Makrophagen beeinflussen können.

Dagegen zeigte keine der Exosomen-Behandlungen in THP1- oder in BlaER1-Zellen, eine positive Beeinflussung der Expression der M1-Marker.

Der Grund, dass die THP1-Zellen wesentlich einheitlicher auf die Exosomen-Behandlung mit einer verstärkten Expression des CCL13 Markers reagierten, während die BlaER1-Zellen unterschiedlich stark M2-Marker exprimierten, mag an der unterschiedlichen Herkunft der beiden Makrophagenzelllinien liegen. THP1-Zellen sind eine Monozytenzelllinie, während BlaER1-Zellen im Grunde B-Zellen sind, die durch ein integriertes Plasmid in Monozyten transdifferenziert werden können. Die unterschiedlichen Effekte auf die beiden differenziellen Zelllinien durch die Tumorzell-Exosomen liefern einen weiteren Hinweis für die Plastizität der Makrophagenphänotypen und dass es keine simple M1/M2 Typ Zuordnung gibt.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Exosomen auf Makrophagen über ein Zeitfenster von 24 Stunden untersucht. Interessant wäre es auch zu untersuchen, ob Exosomen über einen längeren Zeitraum die Polarisation von Makrophagen noch stärker beeinflussen können. Dabei muss jedoch das Problem der begrenzten Stabilität (siehe Punkt 4.2) einmal polarisierter Makrophagen berücksichtigt werden.

Einen kritischen Punkt stellte die Menge der eingesetzten Exosomen zur Behandlung von Zellen dar. Es konnten nicht vor jeder Exosomen-Behandlung eine NTA-Analyse durchgeführt werden. Dies ist eine zu aufwendige Analyse und geht auch mit Probenverlust einher. Zumal diese Methode bei der Größenbestimmung der Partikel nicht zwischen Vesikeln und Proteinaggregaten gleicher Größe unterscheiden kann (Colombo, Raposo, and Théry 2014). Jedoch liegen zu einigen Exosomen-Behandlungen NTA-Ergebnisse vor. Exosomen von LON 556-Zellen wurden mit einem durchschnittlichen Volumen von 30 bis 46 μL je *in vitro* Behandlung von Makrophagen eingesetzt. Dies entspricht einer durchschnittlichen Partikelmenge von $3,9 \times 10^{10}$ bis $2,2 \times 10^{11}$. Auch wenn von S2-007- und PaTu 8988t keine direkten Partikelmengen zur Exosomen-Behandlung vorliegen, so ergab die einfache NTA-Analyse der beiden Zelllinien Partikelmengen von $1,1 \times 10^{10}$ bis $3,5 \times 10^{10}$ Partikel/mL, was einer

durchschnittlichen Menge von $3,3 \times 10^8$ bis $1,6 \times 10^9$ für eine Exosomen-Behandlung entsprechen würde. Mendt *et al.* setzte zur *in vivo* Behandlung von Mäusen ähnliche Partikelmenge an Exosomen von durchschnittlich 1×10^8 – 1×10^9 ein (Mendt *et al.* 2018). Demzufolge war die eingesetzte Exosomenmenge weder zu gering noch zu hoch, da spezifische Effekte durch Exosomen auf die Makrophagenpolarisation detektiert werden konnten. Ob allerdings eine zu hohe bzw. zu niedrige Exosomenkonzentration für die Behandlung von Zellen sich negativ auf die durch Exosomen bewirkte Effekte auswirkt, wurde hier nicht gezielt getestet. Wobei auch die Menge der zu behandelnden Zellen einen Einfluss auf die durch Exosomen bewirkten Effekte haben könnte, welche jedoch für jede Versuchsdurchführung gleich eingestellt wurde. Für eine korrekte Angabe der eingesetzten Menge an Exosomen für *in vivo/in vitro* Behandlungen sollte in zukünftigen Versuchen mit Exosomen zuvor eine Konzentrationsreihe für die Exosomen-Behandlung je Zelllinie bezüglich der Partikelmenge und der Menge an eingesetztem μg Protein an Exosomen durchgeführt werden.

4.5 Der Einfluss von IGFII defizienten Tumorzell-Exosomen auf die Makrophagenpolarisation

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass IGFI/IGFII und deren Rezeptoren IGFR1/IGFR2 bei einer Vielzahl an Tumoren eine bedeutende Rolle spielen (Chan *et al.* 1998; Emerman *et al.* 1985; Hankinson *et al.* 1998). Der IGFR1 ist eine Tyrosinkinase, welche intrazelluläre Signalkaskaden für den Zellfortbestand oder die Zellproliferation aktiviert (Belfiore *et al.* 2009; Massoner *et al.* 2010; Samani *et al.* 2007). Interessanterweise wird IGFR1 in einigen Tumoren, so auch in Pankreaskarzinom-Zelllinien, überexprimiert, was mit einem höheren Tumorgrad und schlechten Überlebensraten assoziiert wird (Gallagher and LeRoith 2011; Hakam, Fang, and Karl 2003; Pollak 2008; Valsecchi *et al.* 2012). *In vitro* Experimente haben gezeigt, dass die Proliferation von Pankreaskarzinom-Zelllinien stark ansteigt, wenn diese mit rekombinantem Insulin, IGFI und IGFII behandelt werden (Bergmann *et al.* 1995, 1996; Kornmann *et al.* 1998). Daher erscheint IGFR1 als vielversprechend für neue Therapieansätze. Jedoch führten entwickelte Antikörper gegen IGFR1 nicht zu den erhofften signifikanten Verbesserungen des Krankheitsverlaufes (Yee 2012). Zudem gibt es das gehäufte Vorkommen von Hybrid IGFR:Insulin-Rezeptor (IR) Rezeptoren in humanen Krebserkrankungen, welche im Fall einer Tumorentwicklung die gleichen Signalkaskaden ausführen können (Fisher *et al.* 1996; Malaguarnera and Belfiore 2011;

Pandini et al. 1999; Vella et al. 2001). Speziell IR-A:IGFR1 haben eine hohe Affinität für IGFII, was die Ansprechbarkeit von Zellen für die mitogene Signalübertragung von IGFII drastisch erhöht (Belfiore et al. 2009). TAMs im Stroma sind beispielsweise affin für IGF-Liganden. So korreliert bei Patienten mit Pankreastumoren die Einwanderung von TAMs mit einer erhöhten IR:IGFR1 Expression. Eine Inhibition des IR:IGFR1 Systems in präklinischen Krankheitsmodellen verbesserte die Wirkung von Chemotherapien (Ireland et al. 2016; Mutgan et al. 2018).

Dass IGFII mRNA in großen Mengen von S2-007-Zellen sowohl in Mono- als auch unter Ko-Kulturbedingungen in Exosomen verpackt wird, stellte einen völlig neuen Aspekt dar. Da dessen funktionelle Relevanz bisher ungeklärt ist, erschien es von besonderem Interesse zu untersuchen ob ein IGFII-knock-down in S2-007-Zellen die Polarisation von THP1-Zellen beeinflussen könnte. Die Experimente ergaben jedoch, dass Exosomen aus IGFII defizienten S2-007-Zellen nach 24-stündiger Inkubation immer noch die Expression von CCL13 in M2 THP1-Zellen begünstigen. Entweder begünstigen neben IGFII noch andere in Exosomen verpackte Moleküle die CCL13 Expression, oder der IGFII knock-down war nicht effizient genug und es wurde nach wie vor IGFII mRNA in Exosomen verpackt. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass ein noch effizienterer knock-down der IGFII mRNA mit hoher Wahrscheinlichkeit die Vitalität der Tumorzellen beeinträchtigen würde, da diese auch IGFII zum Überleben benötigen. Ideal wäre daher ein System, das es erlauben würde, gezielt die Verpackung von IGFII mRNA oder auch andere Substanzen in Exosomen zu unterbinden, ohne die Gesamtspiegel in den Zellen wesentlich zu verändern. Eine solche Technologie steht allerdings bislang nicht zur Verfügung. Somit bedarf es noch einiger Optimierungen und weiterer Experimente, um mit Sicherheit eine Aussage über den Einfluss der IGFII mRNA auf die Polarisation von THP1-Zellen treffen zu können.

4.6 Einfluss der Inhibition miRNAs unter Ko-Kulturbedingungen auf die Makrophagenpolarisation

Die Auswertung der Sequenzierungsdaten der Exosomen aus S2-007-Zellen, M2 THP1-Zellen und unter Ko-Kulturbedingungen ergab, dass die miRNAs 6724, 4497 und 5787 ausschließlich unter Ko-Kulturbedingungen in Exosomen verpackt werden. Dieses Ergebnis konnte in weiteren Ko-Kulturen mit anschließender Exosomen-Isolation bestätigt werden. Jedoch konnte auch festgestellt werden, dass diese miRNAs sowohl von M2-polarisierten THP1-Zellen als auch von S2-007-Zellen in Mono- und unter Ko-Kulturbedingungen exprimiert werden. Die Funktionen der hier identifizierten miRNA-Kandidaten sind in der Literatur im Zusammenhang mit Pankreastumoren noch nicht beschrieben worden. Vermutet wird allerdings, dass miRNA 5787 beim Glukosemetabolismus in kolorektalen Tumoren eine Rolle spielt (X. Guo et al. 2017). miRNA 4497 dagegen spielt offenbar durch die Bindung des Zielgens gastrulation brain homeobox 2 (GBX2) eine supprimierende Rolle in laryngela squamous cell carcinoma (LSCC) (X. Chen, Zhang, and Tang 2018). Auf Grund dessen, dass einige Funktionen der miRNAs bereits in anderen Tumoren beschrieben sind, erschien es als sinnvoll deren Funktion im Pankreaskarzinom weiter zu untersuchen.

Da hier speziell der Einfluss von Seiten der Tumorzellen auf polarisierte Makrophagen von Interesse war, wurde in einem nachfolgenden Experiment untersucht, ob die Inhibition der miRNAs auf der Seite der Makrophagen und anschließender Ko-Kultur mit Tumorzellen zu einer gegenregulierten Makrophagenpolarisation im Vergleich zur Makrophagenbehandlung mit einfach konditioniertem Tumorzell-Medium führen würde. Bei diesem Experiment wurden die miRNAs mittels miRNA-Inhibitoren in den Makrophagen blockiert (siehe Punkt 2.2.8) und erneut eine Ko-Kultur mit S2-007-Zellen durchgeführt. 72 Stunden nach der Ko-Kultur wurde die Expression der M2-Marker in THP1-Zellen im Vergleich zu PMA induzierten THP1-Zellen analysiert (siehe Punkt 2.2.2 a, c und e1). Da dieses Experiment explorativ nur einmal durchgeführt werden konnte, konnten jedoch keine zielführenden Effekte aus dem Ergebnis abgeleitet werden.

Bevor das Experiment wiederholt werden kann, muss zuvor eine vollständige Etablierung der miRNA-Inhibition durchgeführt werden. Das beinhaltet zum einen die Optimierung der Transfektionseffizienz der miRNA-Inhibitoren und zum anderen die Bestimmung einer geeigneten miRNA-Inhibitor-Konzentration (bis hin zum Schwellenwert der toxischen Auswirkung auf die Zellen). Die Effizienz der

Transfektion kann beispielsweise über einen fluoreszenzmarkierten miRNA-Inhibitor gemessen werden (Esau 2008). Die Auswirkung der Toxizität kann mittels MTT-Assay überprüft werden. Das Erreichen der toxischen Wirkung liefert dabei auch einen Hinweis auf die Effizienz der Transfektion. Des Weiteren muss über den Zeitraum der Ko-Kultur von 72 Stunden eine entsprechende Evaluierung der Funktion bzw. Effektivität der tatsächlichen miRNA-Inhibition nachgewiesen werden. Die einfachste Lösung wäre, die Aktivität der miRNA über das Level einer bestimmten Ziel-mRNA oder eines Ziel-Proteins zu messen. Das ist jedoch nicht immer möglich. Die gängigste Methode zur Messung der miRNA-Aktivität ist die Verwendung eines Reportergenes, wie z.B. Luciferase oder *green fluorescent protein* (GFP) (Esau 2008). Diese Reportergene haben miRNA-Bindestellen in der 3' untranslatierten Region (3'-UTR). Davis *et al.* haben beispielsweise einen Luciferase-Sensor-Assay für die miRNA 21 in Hela-Zellen entwickelt (Davis et al. 2006; Esau 2008).

4.7 Ausblick/Schlussfolgerung

Sowohl für Pankreaskarzinome als auch für andere solide Tumore konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen im Stande sind, eingewanderte Makrophagen in Richtung eines M2 –ähnlichen Phänotyps zu polarisieren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Tumorzell-sezernierte Exosomen die Polarisation von M2 Makrophagen beeinflussen. So veränderten Tumorzell-Exosomen das Zytokinprofil sowohl in THP1- als auch in BlaER1-Zellen. Die Sequenzierung sezernierter Exosomen aus S2-007-Zellen und THP1 Makrophagen unter Ko-Kulturbedingungen ergab einige vielversprechende Kandidaten, wie IGFII mRNA und die miRNAs 6724, 4497 und 5787, welche eine mögliche Rolle bei der Differenzierung von tumorassoziierten Makrophagen spielen und damit die Tumorprogression bei exokrinen Pankreastumoren begünstigen könnten.

In zukünftig folgenden Arbeiten sollten zusätzlich zu dem Makrophagen-Zellsystem die Auswirkung von Pankreas-Tumorzell-Exosomen auf die Polarisation primärer humaner Makrophagen untersucht werden. Außerdem sollte geklärt werden, ob weitere Kandidaten aus der Sequenzierung von Exosomen aus den primären Pankreaskarzinomzellen LON 556 in Kombination mit THP1- bzw. BlaER1-Zellen ermittelt werden können.

Des Weiteren stellen sich einige Fragen auf funktioneller Ebene.

- Welche Rolle spielen die durch Tumorzell-Exosomen-Behandlung überexprimierten Marker CCL13, CCL17 und CCL18 in Makrophagen und wie wirken sich diese auf Pankreastumore aus?
- Welche Mechanismen tragen zur Wirkung der hier identifizierten miRNAs und IGFII auf die Polarisation von Makrophagen bei?
- Mit welchen Interaktionspartnern sind IGFII bzw. die miRNAs 6724, 4497 und 5787 assoziiert?
- Welche Mechanismen regulieren die Verpackung spezifischer Moleküle in Exosomen unter Ko-Kulturbedingungen?
- Eignen sich die hier identifizierten in Vesikel verpackten miRNAs als potentielle Biomarker zur Diagnose oder Entwicklung neuer Therapieansätze in Pankreastumoren?

5 Zusammenfassung

Tumorassoziierte Makrophagen machen einen erheblichen Teil des tumorassoziierten Stromas von Pankreaskarzinomen aus. Verschiedene Studien haben bereits gezeigt, dass Makrophagen in vielen humanen Tumoren, auch in Pankreastumoren, einen überwiegend tumorfördernden M2-funktionalen Phänotyp besitzen, welcher mit einem schlechten Verlauf des Krankheitsbildes assoziiert wird. miRNAs und andere nicht-kodierende RNA-Spezies spielen wichtige regulatorische Rollen in der Entstehung und Progression maligner Tumore, darunter auch in der funktionellen Interaktion von Tumorzellen mit Zellen des umgebenden entzündlichen Stromas. Momentan wird davon ausgegangen, dass Tumorzellen neben anderen Kommunikationsmethoden vor allem extrazelluläre Vesikel zur Zell-Zell-Kommunikation benutzen. Über diese Vesikel können Proteine, Lipide oder Nukleinsäuren, insbesondere auch miRNAs, ausgetauscht werden und so gezielt zelluläre Prozesse der Zielzellen verändert werden, was wiederum Auswirkungen auf die Tumormikroumgebung hat.

Nach der Etablierung eines Polarisationsprotokolls von primären humanen Makrophagen und Makrophagen-Zelllinien, konnte mittels real-time PCR Analyse von THP1- und BlaER1-Zellen nach Ko-Kulturexperimenten mit Pankreaskarzinom-Zelllinien gezeigt werden, dass M1-Marker über den Zeitraum der Ko-Kultur sehr schnell reduziert wurden, während ein M2-ähnlicher Phänotyp, besonders in Ko-Kultur mit LON 556 Tumorzellen, länger beibehalten wurden. Die Behandlung von THP1-Makrophagen mit konditioniertem Tumorzellmedium von S2-007-Zellen und PaTu 8988t-Zellen begünstigte die M2-Polarisation in THP1-Zellen zudem wesentlich stärker. Um zu untersuchen, ob diese Ergebnisse durch Tumorzell-sezernierte extrazelluläre Vesikeln bewirkt wurden, wurde ein Protokoll zur Isolation von Exosomen etabliert.

Real-time PCR Analysen von THP1-/BlaER1-Zellen zeigten, dass in THP1-Zellen die Expression des M2-Markers CCL13 durch Tumorzell-Exosomen positiv beeinflusst wird, während in BlaER1-Zellen die Zytokine CCL13, CCL17 und CCL18 verstärkt exprimiert werden. In beiden Zelllinien zeigten die Tumorzell-Exosomen keinen Einfluss auf die M1-Marker CXCL9, CXCL10 und CCL2. Die Sequenzierung sezernierter Exosomen aus S2-007-Zellen und THP1-Makrophagen unter Ko-Kulturbedingungen, ermöglichte die Identifizierung einiger vielversprechender

Kandidaten wie IGFII mRNA und miRNAs 6724, 4497 und 5787. Die genaue Funktion der Kandidaten bezüglich der Differenzierung von tumorassoziierten Makrophagen in Pankreastumoren müssen noch mittels Knock-down von IGFII mRNA oder miRNA-Inhibition näher untersucht werden. Zusammenfassend konnte in der Arbeit gezeigt werden, dass Tumorzell-sezernierte Exosomen die Polarisation von M2 Makrophagen positiv beeinflussen. Die hier identifizierten, in Tumor-Exosomen verpackten Kandidaten, IGFII mRNA und die miRNAs 6724, 4497 und 5787, könnten eine mögliche Rolle bei der Differenzierung von tumorassoziierten Makrophagen spielen und dadurch die Tumorprogression bei exokrinen Pankreastumoren begünstigen. Nach Aufklärung derer genauen Funktion könnten sie als möglicher Ansatzpunkt für neue Therapien oder als Biomarker genutzt werden.

6 Summary

Tumor associated macrophages represent a considerable part of the tumor-associated stroma in pancreatic cancer. Various studies have shown that many of the macrophages in human tumors, including PDAC, show a tumor promoting M2 functional phenotype, which is associated with poor prognosis. miRNAs and other non-coding RNAs play important regulatory roles in the development and progression of malignant tumors, including the functional interaction of tumor cells and cells of the surrounding inflammatory stroma. Currently, it is assumed that tumor cells use, among others, extracellular vesicles for cell-to-cell exchange of biomolecules. Via these vesicles proteins, lipids or nucleic acids, especially miRNAs, are exchanged and contribute to altering cellular processes of target cells and thereby have effects on the tumor microenvironment.

After establishing a protocol for primary human macrophage and macrophage cell line polarisation, real-time PCR analysis of THP1/BlaER1 cells after functional co-culture experiments with pancreatic tumor cell lines showed that M1-Markers reduce rapidly during co-culture experiments, while the M2 polarization especially in co-culture with LON 556 tumor cells is retained to a higher degree. The treatment of THP1 macrophages with conditioned tumor cell medium of S2-007 and PaTu 8988t cells promotes the M2 polarization much stronger. To check if these findings were caused by tumor cell secreted extra cellular vesicles, a purification protocol for exosomes was established. Next, THP1/ BlaER1 macrophages were treated with exosomes which were

secreted by pancreatic tumor cells. Real-time PCR analysis of THP1/ BlaER1 cells showed here that in THP1 cells exosomes from cancer cells caused a markedly increased expression of the M2-Marker CCL13, while in BlaER1 cells the cytokines CCL13, CCL17 and CCL18 were increased. In both cell lines, tumor-derived exosomes exhibit no effects on the M1-Markers CXCL9, CXCL10 and CCL2. The sequencing of secreted exosomes from S2-007 cells and THP1 macrophages after co-culture enabled the identification of some promising candidate molecules, like IGFII mRNA and miRNAs 6724, 4497 and 5787. The exact function of these candidates concerning the differentiation of tumor associated macrophages in pancreatic tumors have to be examined in more detail using knock down methods for IGFII or miRNA inhibition. To summarize, this study showed that tumor cell derived exosomes promote the polarisation of M2 macrophages. The identified candidates in tumor derived exosomes, IGFII and miRNAs 6724, 4497 and 5787, could play an important role in differentiation of tumor associated macrophages and thereby promote tumor progression in exocrine pancreatic tumors.

Literaturverzeichnis

- Admyre, Charlotte et al. 2007. "Exosomes with Immune Modulatory Features Are Present in Human Breast Milk." *The Journal of Immunology* 179: 1969–78.
- Al-Nedawi, Khalid et al. 2008. "Intercellular Transfer of the Oncogenic Receptor EGFRvIII by Microvesicles Derived from Tumour Cells." *Nature Cell Biology* 10: 619–24.
- Albini, Adriana, and Michael Sporn. 2007. "The Tumour Microenvironment as a Target for Chemoprevention." *Nature reviews. Cancer* 7(2): 131–39.
- Andreola, Giovanna et al. 2002. "Induction of Lymphocyte Apoptosis by Tumor Cell Secretion of FasL-Bearing Microvesicles." *The Journal of experimental medicine* 195(10): 1303–16.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12021310>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2193755>.
- Andreu, Zoraida, and María Yáñez-Mó. 2014. "Tetraspanins in Extracellular Vesicle Formation and Function." *Frontiers in Immunology* 5(SEP): 1–12.
- Antonios, Joseph K. et al. 2013. "Macrophage Polarization in Response to Wear Particles in Vitro." *Cellular and Molecular Immunology* 10(6): 471–82.
<http://dx.doi.org/10.1038/cmi.2013.39>.
- Bach, Duc Hiep, Ji Young Hong, Hyen Joo Park, and Sang Kook Lee. 2017. "The Role of Exosomes and MiRNAs in Drug-Resistance of Cancer Cells." *International Journal of Cancer* 141(2): 220–30.
- Bailey, J. M. et al. 2008. "Sonic Hedgehog Promotes Desmoplasia in Pancreatic Cancer." *Infectious Disease Clinics of North America* 14(19): 5995–6004.
- Bailey, Peter et al. 2016. "Exploiting the Neoantigen Landscape for Immunotherapy of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Scientific Reports* 6(October): 1–8.
<http://dx.doi.org/10.1038/srep35848>.
- Barleon, B et al. 1996. "Migration of Human Monocytes in Response to Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Is Mediated via the VEGF Receptor Flt-1." *Blood* 87(8): 3336–43.
- Bauer, C. A. et al. 2014. "Dynamic Treg Interactions with Intratumoral APCs Promote Local CTL Dysfunction." *The Journal of clinical investigation* 124(6): 2425–40.
- Bauer, Christian et al. 2016. "Prevailing over T Cell Exhaustion: New Developments in the Immunotherapy of Pancreatic Cancer." *Cancer Letters* 381(1): 259–68.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2016.02.057>.
- Belfiore, Antonino et al. 2009. "Insulin Receptor Isoforms and Insulin Receptor/Insulin-like Growth Factor Receptor Hybrids in Physiology and Disease." *Endocrine Reviews* 30(6): 586–623.
- Bergmann, Uwe et al. 1995. "Insulin-like Growth Factor I Overexpression in Human Pancreatic Cancer: Evidence for Autocrine and Paracrine Roles." *CANCER RESEARCH* 55: 2007–11.
- Bergmann, Uwe et al. 1996. "Increased Expression of Insulin Receptor Substrate-1 in Human Pancreatic Cancer." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 220(3): 886–90.
- Bolm, Louisa et al. 2017. "The Role of Fibroblasts in Pancreatic Cancer: Extracellular Matrix Versus Paracrine Factors." *Translational Oncology* 10(4): 578–88.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tranon.2017.04.009>.
- Bradford, Marion M. 1976. "Sistema Séptico Domiciliario | Rotomoldeo En Colombia

- Tanques Plasticos En Colombia Rotoplast.” *Analytical Biochemistry* 72: 248–54.
<http://www.rotoplast.com.co/sistema-septico-domiciliario/>.
- Brinton, L. T., H. S. Sloane, Mark Kester, and K. A. Kelly. 2015. “Formation and Role of Exosomes in Cancer.” *cell Mol. Life. Sci.* 72(4): 659–71.
- Bronkhorst, Inge H G et al. 2011. “Detection of M2-Macrophages in Uveal Melanoma and Relation with Survival.” *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 52(2): 643–50.
- Brown, Martin J., Lawrence Recht, and Samuel Stober. 2017. “The Promise of Targeting Macrophages in Cancer Therapy.” *Clin Cancer Res.* 23(13): 3241–50.
- Catenacci, Daniel V.T. et al. 2015. “Randomized Phase Ib/II Study of Gemcitabine plus Placebo or Vismodegib, a Hedgehog Pathway Inhibitor, in Patients with Metastatic Pancreatic Cancer.” *Journal of Clinical Oncology* 33(36): 4284–92.
- Chan, J. M. et al. 1998. “Plasma Insulin-Like Growth Factor-I and Prostate Cancer Risk: A Prospective Study.” *Science* 279: 563–66.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11106682.
- Chen, Shao jie et al. 2018. “Tumor-Driven like Macrophages Induced by Conditioned Media from Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Promote Tumor Metastasis via Secreting IL-8.” *Cancer Medicine* (April): 5679–90.
- Chen, Xudong, Litao Zhang, and Shixiong Tang. 2018. “MicroRNA-4497 Functions as a Tumor Suppressor in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma via Negatively Modulation the GBX2.” *Auris Nasus Larynx*: 6–13.
<https://doi.org/10.1016/j.anl.2018.05.005>.
- Chu, Gerald C., Alec C. Kimmelman, Aram F. Hezel, and Ronald a. DePinho. 2007. “Stromal Biology of Pancreatic Cancer.” *Journal of Cellular Biochemistry* 101(4): 887–907.
- Cocucci, Emanuele, and Jacopo Meldolesi. 2015. “Ectosomes and Exosomes: Shedding the Confusion between Extracellular Vesicles.” *Trends in Cell Biology* 25(6): 364–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2015.01.004>.
- Colombo, Marina et al. 2013. “Analysis of ESCRT Functions in Exosome Biogenesis, Composition and Secretion Highlights the Heterogeneity of Extracellular Vesicles.” *Journal of Cell Science* 126(24): 5553–65.
<http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.128868>.
- Colombo, Marina, Graça Raposo, and Clotilde Théry. 2014. “Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles.” *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 30(1): 255–89.
<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>.
- Cubilla, Antonio L., and Patrick J. Fitzgerald. 1976. “Morphological Lesions Associated with Human Primary Invasive Nonendocrine Pancreas Cancer.” *Cancer Research* 36(July): 2690–98.
- Daley, Donnele et al. 2016. “T δ T Cells Support Pancreatic Oncogenesis by Restraining A β T Cell Activation.” *Cell* 166(6): 1485–99.
- Davis, Scott, Bridget Lollo, Susan Freier, and Christine Esau. 2006. “Improved Targeting of MiRNA with Antisense Oligonucleotides.” *Nucleic Acids Research* 34(8): 2294–2304.
- Detlefsen, Sönke, Bence Sipos, Bernd Feyerabend, and Günter Klöppel. 2005. “Pancreatic Fibrosis Associated with Age and Ductal Papillary Hyperplasia.” *Virchows Archiv* 447(5): 800–805.
- Dolcetti, Riccardo et al. 1999. “High Prevalence of Activated Intraepithelial Cytotoxic T Lymphocytes and Increased Neoplastic Cell Apoptosis in Colorectal Carcinomas with Microsatellite Instability.” *American Journal of Pathology* 154(6): 1805–13.

- Dorsch, M et al. 1993. "Macrophage Colony-Stimulating Factor Gene Transfer into Tumor Cells Induces Macrophage Infiltration but Not Tumor Suppression." *European journal of immunology* 23(1): 186–90.
- Elsässer, H P, U Lehr, B Agricola, and H F Kern. 1992. "Establishment and Characterisation of Two Cell Lines with Different Grade of Differentiation Derived from One Primary Human Pancreatic Adenocarcinoma." *Virchows Archiv. B, Cell pathology including molecular pathology* 61(5): 295–306. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1348891>.
- Emerman, J: T., M. Leahy, P. W. Gout, and N. Bruchovsky. 1985. "Elevated Growth Hormone Levels in Sera from Breast Cancer Patients." *Hormone and Metabolic Research* 17(8): 421–24.
- Erkan, Mert et al. 2012. "The Role of Stroma in Pancreatic Cancer: Diagnostic and Therapeutic Implications." *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 9(8): 454–67. <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2012.115>.
- Esau, Christine C. 2008. "Inhibition of MicroRNA with Antisense Oligonucleotides." 44: 55–60.
- Evans, R. D., L. van Herwerden, G. R. Russ, and A. J. Frisch. 2010. "Strong Genetic but Not Spatial Subdivision of Two Reef Fish Species Targeted by Fishers on the Great Barrier Reef." *Fisheries Research* 102(1–2): 16–25.
- Fabbri, Muller et al. 2012. "MicroRNAs Bind to Toll-like Receptors to Induce Prometastatic in Fl Ammatory Response." 109(31).
- Fisher, W.E., L.G. Boros, J. William, and W.J. Schirmer. 1996. "Insulin Promotes Pancreatic Cancer: Evidence for Endocrine Influence on Exocrine Pancreatic Tumors." *Journal of Surgical Research* 63(1): 310–13. <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed4&NEWS=N&AN=1996199259>.
- Flaberg, Emilie et al. 2011. "High-Throughput Live-Cell Imaging Reveals Differential Inhibition of Tumor Cell Proliferation by Human Fibroblasts." *International Journal of Cancer* 128(12): 2793–2802.
- Freeman, Gordon J. et al. 2000. "Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation." *The Journal of Experimental Medicine* 192(7): 1027–34. <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.192.7.1027>.
- Fukunaga, A et al. 2004. "CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes Together with CD4+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Dendritic Cells Improve the Prognosis of Patients with Pancreatic Adenocarcinoma." *Pancreas* 28(1): e26–31.
- Gallagher, Emily J., and Derek LeRoith. 2011. "Minireview: IGF, Insulin, and Cancer." *Endocrinology* 152(7): 2546–51.
- Garcia, Julie et al. 2012. "Tiel Deficiency Induces Endothelial-Mesenchymal Transition." *EMBO Reports* 13(5): 431–39.
- Gastpar, Robert et al. 2005. "Heat Shock Protein 70 Surface-Positive Tumor Exosomes Stimulate Migratory and Cytolytic Activity of Natural Killer Cells." *American Journal of Health Studies* 65(12): 5238–47. <http://proquest.umi.com/pqdweb?did=1352084411&Fmt=7&clientId=45082&RQT=309&VName=PQD>.
- Globisch, Theresa et al. 2014. "Cytokine-Dependent Regulation of Dendritic Cell Differentiation in the Splenic Microenvironment." *European Journal of Immunology* 44(2): 500–510.
- Gould, Stephen J, and Graça Raposo. 2013. "As We Wait: Coping with an Imperfect Nomenclature for Extracellular Vesicles." *Journal of extracellular vesicles* 2: 3–5. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3760635&tool=pmcent>

- rez&rendertype=abstract.
- Graves, D.T., Y.L. Jiang, M.J. Williamson, and A.J. Valente. 1989. "Identification of Monocyte Chemotactic Activity Produced by Malignant Cells." *Science* 245(1980): 1490–93.
- Greening, David W., and Richard J. Simpson. 2018. "Understanding Extracellular Vesicle Diversity – Current Status." *Expert Review of Proteomics* 00(00): 14789450.2018.1537788.
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14789450.2018.1537788>.
- Guo, Songchuan et al. 2017. "Immunotherapy in Pancreatic Cancer: Unleash Its Potential through Novel Combinations." *World Journal of Clinical Oncology* 8(3): 230. <http://www.wjgnet.com/2218-4333/full/v8/i3/230.htm>.
- Guo, Xiaocan et al. 2017. "Single Tumor-Initiating Cells Evade Immune Clearance by Recruiting Type II Macrophages." *Genes and Development* 31(3): 247–59.
- Hahn, S a et al. 1996. "DPC4, a Candidate Tumor Suppressor Gene at Human Chromosome 18q21.1." *Science (New York, N.Y.)* 271(5247): 350–53.
- Hakam, Ardesbir, Quan Fang, and Richard Karl. 2003. "Coexpression of IGF-1R and c-Src Proteins in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." 48(10): 1972–78.
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2000. "The Hallmarks of Cancer." *Cancer Immunology, Immunotherapy* 60(3): 319–26.
- Hankinson, S. E. et al. 1998. "Circulating Concentrations of Insulin-like Growth Factor I and Risk of Breast Cancer." *The Lancet* 351: 1393–96.
<https://arbejdstitilsynet.dk/da/regler/at-vejledninger/aa/d-5-4-aandedraetsvaern>.
- Hingorani, Sunil R. et al. 2018. "HALO 202: Randomized Phase II Study of PEGPH20 Plus Nab-Paclitaxel/Gemcitabine Versus Nab-Paclitaxel/Gemcitabine in Patients With Untreated, Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Journal of Clinical Oncology* 36(4): 359–66.
- Hruban, Ralph H. et al. 2004. "An Illustrated Consensus on the Classification of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms." *American journal of surgical pathology* 28(8): 977–87.
- Hruban, Ralph H., Michael Goggins, Jennifer Parsons, and Scott E. Kern. 2000. "Progression Model for Pancreatic Cancer." *Clinical Cancer Research* 6(8): 2969–72.
- Hu, Guoku, Kristen M. Drescher, and Xian-Ming Chen. 2012. "Exosomal MiRNAs: Biological Properties and Therapeutic Potential." *Frontiers in Genetics* 3(April): 1–9.
- Hwang, Rose F. et al. 2008. "Cancer-Associated Stromal Fibroblasts Promote Pancreatic Tumor Progression." *Cancer* 68(3): 918–26.
- Ireland, Lucy et al. 2016. "Chemoresistance in Pancreatic Cancer Is Driven by Stroma-Derived Insulin-Like Growth Factors." *Cancer Res.* 76(23): 6851–63.
- Jeppesen, Dennis K et al. 2014. "Comparative Analysis of Discrete Exosome Fractions Obtained by Differential Centrifugation." *Journal of extracellular Vesicles* 1: 1–16.
- Jiang, H. et al. 2016. "Targeting Focal Adhesion Kinase Renders Pancreatic Cancers Responsive to Checkpoint Immunotherapy." 22(8): 851–60.
- Jöhrer, Karin et al. 2008. "Tumour-Immune Cell Interactions Modulated by Chemokines." *Expert Opinion on Biological Therapy* 8(3): 269–90.
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14712598.8.3.269>.
- Kalayci, Omer et al. 2004. "Monocyte Chemotactic Protein-4 (MCP-4; CCL-13): A Biomarker of Asthma." *Journal of Asthma* 41(1): 27–33.
- Kalluri, Raghu. 2016. "The Biology and Function of Fibroblasts in Cancer." *Nature Reviews Cancer* 16(9): 582–98. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2016.73>.

- El Kamar, F. G., M. L. Grossbard, and P. S. Kozuch. 2003. "Metastatic Pancreatic Cancer: Emerging Strategies in Chemotherapy and Palliative Care." *The Oncologist* 8(1): 18–34. <http://theoncologist.alphamedpress.org/cgi/doi/10.1634/theoncologist.8-1-18>.
- Kanlikilicer, Pinar et al. 2016. "Ubiquitous Release Of Exosomal Tumor Suppressor MiR-6126 from Ovarian Cancer Cells." 76(24): 7194–7207.
- Katakura, T. et al. 2004. "CCL17 and IL-10 as Effectors That Enable Alternatively Activated Macrophages to Inhibit the Generation of Classically Activated Macrophages." *The Journal of Immunology* 172(3): 1407–13. <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.172.3.1407>.
- Katzmann, David J., Christopher J. Stefan, Markus Babst, and Scott D. Emr. 2003. "Vps27 Recruits ESCRT Machinery to Endosomes during MVB Sorting." *Journal of Cell Biology* 162(3): 413–23.
- Kim, Edward J et al. 2014. "Pilot Clinical Trial of Hedgehog Pathway Inhibitor GDC-0449 (Vismodegib) in Combination with Gemcitabine in Patients with Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma." 20(23): 5937–45.
- Klapman, Jason, and Mokenge P. Malafa. 2008. "Early Detection of Pancreatic Cancer: Why, Who, and How to Screen." *Cancer Control* 15(4): 280–87.
- Kornmann, Marko et al. 1998. "Enhanced Expression of the Insulin Receptor Substrate-2 Docking Protein in Human Pancreatic Cancer." *Cancer Research* 58(19): 4250–54.
- Kowal, Joanna et al. 2016. "Proteomic Comparison Defines Novel Markers to Characterize Heterogeneous Populations of Extracellular Vesicle Subtypes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(8): E968–77. <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1521230113>.
- Kuen, Janina, Diana Darowski, Tobias Kluge, and Meher Majety. 2017. "Pancreatic Cancer Cell/Fibroblast Co-Culture Induces M2 like Macrophages That Influence Therapeutic Response in a 3D Model." *Plos One* 12(7): e0182039. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28750018> <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0182039>.
- Kumar, Dhruv, Dwijendra Gupta, Sharmila Shankar, and Rakesh K. Srivastava. 2014. "Biomolecular Characterization of Exosomes Released from Cancer Stem Cells: Possible Implications for Biomarker and Treatment of Cancer." *Oncotarget* 6(5). <http://www.oncotarget.com/fulltext/2462>.
- Kumar, Vinit et al. 2017. "Cancer-Associated Fibroblasts Neutralize the Anti-Tumor Effect of CSF1 Receptor Blockade by Inducing PMN-MDSC Infiltration of Tumors." 32(5): 654–68.
- Kurahara, Hiroshi et al. 2011. "Significance of M2-Polarized Tumor-Associated Macrophage in Pancreatic Cancer." *Journal of Surgical Research* 167(2): e211–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2009.05.026>.
- Kuwada, Kazuya et al. 2018. "The Epithelial-to-Mesenchymal Transition Induced by Tumor-Associated Macrophages Confers Chemoresistance in Peritoneally Disseminated Pancreatic Cancer." 2: 1–10.
- Lagos-Quintana, M, R Rauhut, W Lendeckel, and T Tuschl. 2001. "Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs." *Science* 294(5543): 853–58.
- Le, D T et al. 2015. "PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency." *N Engl J Med* 372(26): 2509–20.
- Li, Pin et al. 2017. "Progress in Exosome Isolation Techniques." *Theranostics* 7(3): 789–804.
- Liu, C Y et al. 2013. "M2-Polarized Tumor-Associated Macrophages Promoted Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer Cells, Partially through

- TLR4/IL-10 Signaling Pathway.” *Lab Invest* 93(7): 844–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23752129>.
- Ma, Junliang et al. 2010. “The M1 Form of Tumor-Associated Macrophages in Non-Small Cell Lung Cancer Is Positively Associated with Survival Time.” *BMC cancer* 10: 112.
- Malaguarnera, Roberta, and Antonino Belfiore. 2011. “The Insulin Receptor : A New Target for Cancer Therapy.” 2(December): 1–16.
- Malka, D et al. 2002. “Risk of Pancreatic Adenocarcinoma in Chronic Pancreatitis.” *Gut* 51(6): 849–52.
- Mantovani, Alberto et al. 2004. “The Chemokine System in Diverse Forms of Macrophage Activation and Polarization.” *Trends in Immunology* 25(12): 677–86.
- Mantovani, Alberto et al. 2013. “Macrophage Plasticity and Polarization in Tissue Repair and Remodelling.” *Journal of Pathology* 229(2): 176–85.
- Mantovani, Alberto, Federica Marchesi, Alberto Malesci, and Luigi Laghi. 2018. “Europe PMC Funders Group Tumor-Associated Macrophages as Treatment Targets in Oncology.” 14(7): 399–416.
- Mantovani, Alberto, Antonio Sica, and Massimo Locati. 2005. “Macrophage Polarization Comes of Age.” *Immunity* 23(4): 344–46.
- Martínez-Lorenzo, María José et al. 1999. “Activated Human T Cells Release Bioactive Fas Ligand and APO2 Ligand in Microvesicles 1.” *The Journal of Immunology* 163(6): 1274–81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10415024>.
- Martinez, Fernando O, Siamon Gordon, Massimo Locati, and Alberto Mantovani. 2006. “Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression.” *The Journal of Immunology* 177: 7303–11. <http://www.biotechniques.com/article/000112331>.
- Massoner, P., M. Ladurner-Rennau, I. E. Eder, and H. Klocker. 2010. “Insulin-like Growth Factors and Insulin Control a Multifunctional Signalling Network of Significant Importance in Cancer.” *British Journal of Cancer* 103(10): 1479–84. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6605932>.
- Mathew, Esha et al. 2016. “Mesenchymal Stem Cells Promote Pancreatic Tumor Growth by Inducing Alternative Polarization of Macrophages.” *Neoplasia* 18(3): 142–51. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1476558616000154>.
- Mears, Rainy et al. 2004. “Proteomic Analysis of Melanoma-Derived Exosomes by Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry.” : 4019–31.
- Mendez-Enriquez, E., and E. A. García-Zepeda. 2013. “The Multiple Faces of CCL13 in Immunity and Inflammation.” *Inflammopharmacology* 21(6): 397–406.
- Mendt, Mayela et al. 2018. “Generation and Testing of Clinical-Grade Exosomes for Pancreatic Cancer.” *JCI Insight* 3(8): 1–22. <https://insight.jci.org/articles/view/99263>.
- Meng, Fanbin et al. 2015. “CCL18 Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition, Invasion and Migration of Pancreatic Cancer Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.” *International Journal of Oncology* 46(3): 1109–20.
- Mitchell, Patrick S et al. 2008. “Mitchell et Al. - 2008 - Circulating MicroRNAs as Stable Blood-Based Markers for Cancer Detection.Pdf.” *PNAS* 105(30): 10513–18.
- Moffitt, Richard A et al. 2015. “Virtual Microdissection Identifies Distinct Tumor- and Stroma-Specific Subtypes of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.” *Nature genetics* 47(10): 1168–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26343385>.
- De Monte, Lucia et al. 2011. “Intratumor T Helper Type 2 Cell Infiltrate Correlates with Cancer-Associated Fibroblast Thymic Stromal Lymphopoietin Production and Reduced Survival in Pancreatic Cancer.” *The Journal of experimental medicine*

- 208(3): 469–78.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3058573&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Mueller, Margareta M, and Norbert E Fusenig. 2004. "Friends or Foes - Bipolar Effects of the Tumour Stroma in Cancer." *Nature reviews. Cancer* 4(11): 839–49.
<http://dx.doi.org/10.1038/nrc1477>.
- Murray, Peter J, Judith E Allen, Edward A Fisher, and Toby Lawrence. 2015. "Experimental Guidelines." 41(1): 14–20.
- Mutgan, Ayse Ceren et al. 2018. "Insulin/IGF-Driven Cancer Cell-Stroma Crosstalk as a Novel Therapeutic Target in Pancreatic Cancer." *Molecular Cancer* 17(1): 1–11.
- Nagarsheth, Nisha, Max S. Wicha, and Weiping Zou. 2017. "Chemokines in the Cancer Microenvironment and Their Relevance in Cancer Immunotherapy." *Nature Reviews Immunology* 17(9): 559–72. <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2017.49>.
- Neesse, Albrecht et al. 2018. "Stromal Biology and Therapy in Pancreatic Cancer: Ready for Clinical Translation?" *Gut*: 1–13.
- Niedobitek, G. et al. 2015. "Tumorassoziierte Makrophagen." *Der Pathologe* 36(5): 477–84.
- Nobukawa, Bunsei. 2003. "Genetic Alterations in Pancreatic Cancer." *Pancreas - Pathological Practice and Research* 7: 282–88.
- Nywenig, Timothy M et al. 2017. "Targeting Both Tumour-Associated CXCR2+ Neutrophils and CCR2+ Macrophages Disrupts Myeloid Recruitment and Improves Chemotherapeutic Responses in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Gut*: gutjnl-2017-313738. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29196437>.
- Ogawa, Yuko et al. 2008. "Exosome-Like Vesicles with Dipeptidyl Peptidase IV in Human Saliva." *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 31(6): 1059–62.
<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/bpb/31.1059?from=CrossRef>.
- Öhlund, Daniel et al. 2017. "Distinct Populations of Inflammatory Fibroblasts and Myofibroblasts in Pancreatic Cancer." *The Journal of Experimental Medicine*: jem.20162024. <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20162024>.
- Öhlund, Daniel, Ela Elyada, and David Tuveson. 2014. "Fibroblast Heterogeneity in the Cancer Wound." *The Journal of Experimental Medicine* 211(8): 1503–23.
<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20140692>.
- Ojalvo, Lauren S., William King, Dianne Cox, and Jeffrey W. Pollard. 2009. "High-Density Gene Expression Analysis of Tumor-Associated Macrophages from Mouse Mammary Tumors." *American Journal of Pathology* 174(3): 1048–64.
- Olive, Kenneth P et al. 2009. "Chemotherapy in a Mouse Model of Pancreatic Cancer." *Science* 324(5933): 1457–61.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2998180&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ong, Siew Min et al. 2012. "Macrophages in Human Colorectal Cancer Are Pro-Inflammatory and Prime T Cells towards an Anti-Tumour Type-1 Inflammatory Response." *European Journal of Immunology* 42(1): 89–100.
- Ormanns, Steffen et al. 2014. "Pathologie Und Molekularpathologie Des Pankreaskarzinoms." *Trillium Krebsmedizin* 23(3): 110–15.
- Pandini, Giuseppe et al. 1999. "Insulin and Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) Receptor Overexpression in Breast Cancers Leads to Insulin / IGF-I Hybrid Receptor Overexpression: Evidence for a Second Mechanism of IGF-I Signaling 1." 5(July): 1935–44.
- Peinado, H et al. 2012. "Melanoma Exosomes Educate Bone Marrow Progenitor Cells toward a Pro-Metastatic Phenotype through MET." 18(6): 883–91.
- Piper, Robert C., and David J. Katzmman. 2007. "Biogenesis and Function of

- Multivesicular Bodies.” *Annu Rev Cell Dev Biol.* 23: 519–47.
- Pollak, Michael. 2008. “Insulin and Insulin-like Growth Factor Signalling in Neoplasia.” *Nature Reviews Cancer* 8(12): 915–28.
- Pollard, Jeffrey W. 2004. “Tumour-Educated Macrophages Promote Tumour Progression and Metastasis.” 4: 71–78.
- Pothula, Srinivasa P. et al. 2016. “Hepatocyte Growth Factor Inhibition: A Novel Therapeutic Approach in Pancreatic Cancer.” *British Journal of Cancer* 114(3): 269–80. <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2015.478>.
- Pothula, Srinivasa P. et al. 2017. “Targeting the HGF/c-MET Pathway: Stromal Remodelling in Pancreatic Cancer.” *Oncotarget* 8(44): 76722–39. <http://www.oncotarget.com/fulltext/20822>.
- Protti, Maria Pia, and Lucia De Monte. 2012. “Cross-Talk within the Tumor Microenvironment Mediates Th2-Type Inflammation in Pancreatic Cancer.” *OncoImmunology* 1(1): 89–91.
- Rapino, Francesca et al. 2013. “C/EBP α Induces Highly Efficient Macrophage Transdifferentiation of B Lymphoma and Leukemia Cell Lines and Impairs Their Tumorigenicity.” *Cell Reports* 3(4): 1153–63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.03.003>.
- Raposo, Graça, and Willem Stoorvogel. 2013. “Extracellular Vesicles: Exosomes, Microvesicles, and Friends.” *Journal of Cell Biology* 200(4): 373–83.
- Ratajczak, J et al. 2006. “REVIEW Membrane-Derived Microvesicles: Important and Underappreciated Mediators of Cell-to-Cell Communication.” 20: 1487–95.
- Richards, K E et al. 2017. “CANCER-ASSOCIATED FIBROBLAST EXOSOMES REGULATE SURVIVAL AND PROLIFERATION OF PANCREATIC CANCER CELLS.” 36(13): 1770–78.
- Ries, Carola H. et al. 2014. “Targeting Tumor-Associated Macrophages with Anti-CSF-1R Antibody Reveals a Strategy for Cancer Therapy.” *Cancer Cell* 25(6): 846–59.
- Robert-Koch-Institut, and Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2015. 10. Ausgabe *Krebs in Deutschland 2011/2012*.
- Robinson, P. J A. 2002. “The Role of MRI in Pancreatic Cancer.” *European Radiology* 12(2): 267–69.
- Samani, Amir Abbas, Shoshana Yakar, Derek LeRoith, and Pnina Brodt. 2007. “The Role of the IGF System in Cancer Growth and Metastasis: Overview and Recent Insights.” *Endocrine Reviews* 28(1): 20–47.
- Schorey, Jeffrey S., and Sanchita Bhatnagar. 2008. “Exosome Function: From Tumor Immunology to Pathogen Biology.” *Traffic* 9(6): 871–81.
- Schraufstatter, Ingrid U., Ming Zhao, Sophia K. Khaldoyanidi, and Richard G. Discipio. 2011. “The Chemokine CCL18 Causes Maturation of Cultured Monocytes to Macrophages in the M2 Spectrum.” *Immunology* 135(4): 287–98.
- Schutysse, E., A. Richmond, and J. Van Damme. 2005. “Involvement of CC Chemokine Ligand 18 (CCL18) in Normal and Pathological Processes.” *J Leukoc Biol* 78(1): 14–26.
- Segura, Elodie, Sebastian Amigorena, and Clotilde Théry. 2005. “Mature Dendritic Cells Secrete Exosomes with Strong Ability to Induce Antigen-Specific Effector Immune Responses.” *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 35(2): 89–93.
- Seufferlein, T. et al. 2013. “S3-Leitlinie Zum Exokrinen Pankreaskarzinom.” *Zeitschrift für Gastroenterologie* 51(12): 1395–1440.
- Shaul, Merav E et al. 2010. “Adipose Tissue Macrophages During High-Fat Diet – Induced Obesity in Mice.” *Diabetes* 59(May): 1171–81.
- Shevchenko, Ivan et al. 2013. “Low-Dose Gemcitabine Depletes Regulatory T Cells and Improves Survival in the Orthotopic Panc02 Model of Pancreatic Cancer.”

- International Journal of Cancer* 133(1): 98–107.
- Shibuya, Kendall C. et al. 2014. “Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Contains an Effector and Regulatory Immune Cell Infiltrate That Is Altered by Multimodal Neoadjuvant Treatment.” *PLoS ONE* 9(5).
- Sica, A., and A. Mantovani. 2012. “Macrophage Plasticity and Polarization: In Vivo Veritas.” *The Journal of clinical investigation* 122(3): 787–95.
- Sica, Antonio, Tiziana Schioppa, Alberto Mantovani, and Paola Allavena. 2006. “Tumour-Associated Macrophages Are a Distinct M2 Polarised Population Promoting Tumour Progression: Potential Targets of Anti-Cancer Therapy.” *European Journal of Cancer* 42(6): 717–27.
- Simpson, Richard J, Justin We Lim, Robert L Moritz, and Suresh Mathivanan. 2009. “Exosomes: Proteomic Insights and Diagnostic Potential.” *Expert review of proteomics* 6(3): 267–83.
- Skelton, Richard A., Ammar Javed, Lei Zheng, and Jin He. 2017. “Overcoming the Resistance of Pancreatic Cancer to Immune Checkpoint Inhibitors.” *Journal of Surgical Oncology* 116(1): 55–62.
- Taniguchi, Shoji, Takeshi Iwamura, and Taketo Katsuki. 1992. “Correlation between Spontaneous Metastatic Potential and Type I Collagenolytic Activity in a Human Pancreatic Cancer Cell Line (SUIT-2) and Sublines.” *Clinical & Experimental Metastasis* 10(4): 259–66.
- Taylor, Douglas D., and Cicek Gercel-Taylor. 2008. “MicroRNA Signatures of Tumor-Derived Exosomes as Diagnostic Biomarkers of Ovarian Cancer.” *Gynecologic Oncology* 110(1): 13–21.
- Thayer, Sarah P et al. 2003. “Hedgehog Is an Early and Late Mediator of Pancreatic Cancer Tumorigenesis.” 425(6960): 851–56.
- Théry, C. et al. 2001. “Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles.” *The Journal of Immunology* 166(12): 7309–18.
<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.166.12.7309>.
- Thery, Clotilde et al. 2006. “Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants.” *Current Protocols in Cell Biology* Chapter 3(1934–2616 (Electronic) LA–eng PT–Journal Article SB–IM): 1–29.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18228490>.
- Tlsty, Thea D, and Lisa M Coussens. 2006. “Tumor Stroma and Regulation of Cancer Development.” *Annual review of pathology* 1: 119–50.
- Torroella-Kouri, Marta et al. 2009. “Identification of a Subpopulation of Macrophages in Mammary Tumor-Bearing Mice That Are Neither M1 nor M2 and Are Less Differentiated.” *Cancer Research* 69(11): 4800–4809.
- Trajkovic-Arsic, Marija, Evdokia Kalideris, and Jens T. Siveke. 2013. “The Role of Insulin and IGF System in Pancreatic Cancer.” *Journal of Molecular Endocrinology* 50(3).
- Tsuchiya, Shigeru et al. 1980. “Establishment and Characterization of a Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line (THP-1).” *International Journal of Cancer* 26(2): 171–76.
- Ulf, N. 2011. *Kurzlehrbuch Histologie*. 3rd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Valadi, Hadi et al. 2007. “Exosome-Mediated Transfer of MRNAs and MicroRNAs Is a Novel Mechanism of Genetic Exchange between Cells.” *Nature cell biology* 9(6): 654–59.
- Valsecchi, Matias E. et al. 2012. “Epidermal Growth Factor Receptor and Insulinlike Growth Factor 1 Receptor Expression Predict Poor Survival in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.” *Cancer* 118(14): 3484–93.

- Vella, V. et al. 2001. "The IGF System in Thyroid Cancer: New Concepts." *Journal of Clinical Pathology - Molecular Pathology* 54(3): 121–24.
- Véron, Philippe et al. 2005. "Accumulation of MFG-E8/Lactadherin on Exosomes from Immature Dendritic Cells." *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 35(2): 81–88.
- Vincent, Audrey et al. 2011. "Pancreatic Cancer." *The Lancet* 378(9791): 607–20. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62307-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62307-0).
- Vizio, D et al. 2009. "Oncosome Formation in Prostate Cancer: Association with a Region of Frequent Chromosomal Deletion in Metastatic Disease." 69(13): 5601–9.
- Wahl, Larry M. et al. 1984. "Isolation of Human Mononuclear Cell Subsets by Counterflow Centrifugal Elutriation (CCE)." 85: 373–83.
- Weagel, E et al. 2015. "Macrophage Polarization and Its Role in Cancer." *Journal of Clinical & Cellular Immunology* 06(04): 4–11. <http://www.omicsonline.org/open-access/macrophage-polarization-and-its-role-in-cancer-2155-9899-1000338.php?aid=59055>.
- Whitcomb, David C. 2004. "Inflammation and Cancer V. Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer." *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 287(2): G315–19.
- Whiteside, Theresa L. 2016. "Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Cancer Progression." *Adv. clin. chem.* 103: 103–41.
- Yang, Mei et al. 2011. "Microvesicles Secreted by Macrophages Shuttle Invasion-Potentiating MicroRNAs into Breast Cancer Cells." *Molecular Cancer* 10(1): 117. <http://www.molecular-cancer.com/content/10/1/117>.
- Ye, Huilin et al. 2018. "Tumor-Associated Macrophages Promote Progression and the Warburg Effect via CCL18/NF-KB/VCAM-1 Pathway in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Cell Death and Disease* 9(453): 1–19. <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-018-0486-0>.
- Yee, Douglas. 2012. "Insulin-like Growth Factor Receptor Inhibitors: Baby or the Bathwater?" *Journal of the National Cancer Institute* 104(13): 975–81.
- Yeo, S. C. L. 2003. "Vps20p and Vta1p Interact with Vps4p and Function in Multivesicular Body Sorting and Endosomal Transport in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Journal of Cell Science* 116(19): 3957–70. <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.00751>.
- Ying, Xiang et al. 2016. "Epithelial Ovarian Cancer-Secreted Exosomal MiR-222-3p Induces Polarization of Tumor-Associated Macrophages." *Oncotarget* 7(28): 43076–87. <http://www.ontotarget.com/fulltext/9246>.
- Yoshikawa, Kiyoshi et al. 2012. "Impact of Tumor-Associated Macrophages on Invasive Ductal Carcinoma of the Pancreas Head." *Cancer Science* 103(11): 2012–20.
- Zhu, Yu et al. 2014. "CSF1/CSF1R Blockade Reprograms Tumor-Infiltrating Macrophages and Improves Response to T Cell Checkpoint Immunotherapy in Pancreatic Cancer Models." 74(18): 5057–69.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A	Adenosin
ALIX	eng. <i>apoptosis-linked gene-2 interacting protein X</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	eng. <i>American Type Culture Collection</i>
BCA	eng. <i>bicinchoninic acid</i>
BLAST	eng. <i>basic local alignment tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	eng. <i>bovine serum albumin</i>
C	Cytosin
CAFs	eng. <i>cancer-associated fibroblasts</i>
Cda	eng. <i>cytidine deaminase</i>
CDKN2A	eng. <i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
cDNA	eng. <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
c-MET	eng. <i>tyrosine-protein kinase Met</i>
CSF1R	eng. <i>colony stimulating factor 1 receptor</i>
CTLA-4	eng. <i>cytotoxic T lymphocyte antigen 4</i>
DCs	dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	eng. <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Deoxyribonukleosidtriphosphat
DPC4	eng. <i>deleted in pancreatic carcinomas locus 4</i>
DTT	Dithiothreitol
ECL	eng. <i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-tetraacetat
EMT	eng. <i>epithelial-mesenchymal transition</i>
eng.	Englisch
ESCRT	eng. <i>endosomal sorting complex required for transport</i>

<i>et. al.</i>	und andere
EVs	extrazelluläre Vesikel
FCS	eng. <i>fetal calf serum</i>
FPKM	Fragmente Per Kilobase
G	Guanosin
<i>g</i>	Zentrifugalkraft
GBX2	eng. <i>Gastrulation Brain Homeobox 2</i>
GM	Golgi-Matrixprotein
GFP	eng. <i>green fluorescent protein</i>
GTPasen	eng. <i>guanosine triphosphate hydrolase</i>
HBSS	eng. Hank's Salt Solution
HGF	eng. <i>hepatocyte growth factor</i>
HIF	eng. <i>hypoxia-inducible factors</i>
HRP	eng. <i>horseradish peroxidase</i>
HSP	eng. <i>heat shock proteins</i>
IDO	Inhibitor Indoximod
IFN γ	eng. <i>Interferon –gamma</i>
IL	Interleukin
iNOS	eng. <i>inducible nitric oxide synthase</i>
INK4a	eng. <i>INhibitors of CDK4</i>
IGFI	eng. <i>insulin-like growth factor I</i>
IGFII	eng. <i>insulin-like growth factor II</i>
kDa	Kilo-Dalton
KPC	Kras ^{LSL.G12D/+} ; p53 ^{R172H/+} ; PdxCretg ⁺
KRAS	eng. <i>kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
L	Liter
LOX	Lysyl Oxidase
LPS	Lipopolysaccharid
LSCC	eng. <i>laryngela squamous cell carcinoma</i>
m	Milli-
μ	Mikro-
MCP	eng. <i>monocyte chemoattractant proteins</i>
M-CSF	eng. <i>Recombinant Human Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
MDSCs	eng. <i>myeloid-derived suppressor cells</i>

MEM	eng. <i>minimum essential media</i>
MHC	eng. <i>major histocompatibility complex</i>
miRNA	MicroRNA
MFG-E8	eng. <i>milk fat globule-EGF factor 8 protein</i>
MRC-5	eng. <i>medical research council cell strain 5</i>
MMR	Mismatch-Reparatur-System
MSCs	eng. <i>mesenchymale stem cells</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
MVBs	eng. <i>multivesicular bodies</i>
MW	Mittelwert
NCBI	eng. <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF-κB	eng. <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NTA	Nanopartikel tracking Analyse
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PanINs	eng. <i>pancreatic intraepithelial neoplasias</i>
PBMC	eng. <i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	eng. <i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	eng. <i>polymerase chain reaction</i>
PD-L1	eng. <i>programmed cell death 1 ligand 1</i>
PEGPH20	eng. <i>pegvorhyaluronidase alfa</i>
PFA	Paraphormaldehyd
PITPNM3	eng. <i>phosphatidylinositol transfer protein membrane-associated 3</i>
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSC	eng. <i>pancreatic stellate cell</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	eng. <i>ribonucleic acid</i>
rpm	eng. <i>rounds per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RPMI	eng. <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	eng. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
siRNA	eng. <i>small interfering RNA</i>

SMAD	eng. <i>small body size mothers against decapentaplegic</i>
stabw.	Standardabweichung
T	Thymin
TAMs	tumorassoziierte Makrophagen
TANs	tumorassoziierten Neutrophile
TBS	eng. <i>tris-buffered saline</i>
TBST	eng. <i>tris-buffered saline Tween</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TIM-3	eng. <i>T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3</i>
TGF- β	eng. <i>transforming growth factor β</i>
TLR	eng. <i>toll-like receptor</i>
TNF α	eng. <i>tumornecrosis factor alpha</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSG101	eng. <i>tumor susceptibility gene 101</i>
TSLP	eng. <i>thymic stromal lymphopoietin</i>
Tween® 20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaurat
VCAM-1	eng. <i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VEGF	eng. <i>vascular endothelial growth factor</i>
Wnt5	eng. <i>wingless Int 5</i>

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: M1/M2 Polarisation am Beispiel der THP1-Zellen	40
Abbildung 2: Ko-Kultur mit THP1-Zellen und Pankreaskarzinom-Zelllinien	42
Abbildung 3: Isolation von extrazellulären Vesikeln	45
Abbildung 4: Die Polarisation von primären Monozyten aus buffy coats führte nach 6 Stunden Stimulation zu M1/M2 spezifischen mRNA-Expressionen	50
Abbildung 5: Die Polarisation von primären Monozyten aus buffy coats führte nach 24 Stunden Stimulation zu M1/M2 spezifischen mRNA-Expressionen	51
Abbildung 6: Die Polarisation von THP1-Zellen führte nach 6 Stunden Stimulation zu M1/M2 spezifischen mRNA-Expressionen.....	53
Abbildung 7: Die Polarisation von BlaER1-Zellen führte nach 6 Stunden Stimulation zu M1/M2 spezifischen mRNA-Expressionen.....	53
Abbildung 8: Einfluss polarisierter Makrophagen auf die Viabilität der Tumorzellen 72 Stunden nach Ko-Kultur	56
Abbildung 9: Einfluss von S2-007-Zellen auf die M1/M2 mRNA-Expression von THP1-Zellen 72 Stunden nach Ko-Kultur	58
Abbildung 10: Einfluss von PaTu 8988t auf die M1/M2 mRNA-Expression von THP1-Zellen 72 Stunden nach Ko-Kultur	58
Abbildung 11: Einfluss von LON 556-Zellen auf die M1/M2 mRNA-Expression von THP1-Zellen 72 Stunden nach Ko-Kultur	59
Abbildung 12: Einfluss von S2-007-Zellen auf die M1/M2 mRNA-Expression von BlaER1-Zellen 72 Stunden nach Ko-Kultur	61
Abbildung 13: Einfluss von PaTu 8988t-Zellen auf die M1/M2 mRNA-Expression von BlaER1-Zellen 72 Stunden nach Ko-Kultur	62
Abbildung 14: Einfluss von LON 556-Zellen auf die M1/M2 mRNA-Expression von BlaER1-Zellen 72 Stunden nach Ko-Kultur	63
Abbildung 15: Viabilität der Tumorzellen 72 Stunden nach Behandlung mit konditioniertem polarisierten THP1/BlaER1-Medium.....	65
Abbildung 16: M1/M2 mRNA-Expression von THP1-Zellen 24 Stunden nach Behandlung mit konditioniertem S2-007-/PaTu 8988t-Medium.....	66
Abbildung 17: Elektronenmikroskopie von Exosomen	67
Abbildung 18: NTA-Analyse von S2-007 und PaTu 8988t Exosomen.....	68
Abbildung 19: NTA-Analyse von LON 556 Exosomen.....	69
Abbildung 20: NTA-Analyse von THP1-M2 und BlaER1-M2 Exosomen	69
Abbildung 21: Western Blot Analyse von Exosomen und Gesamtzelllysate	70
Abbildung 22: Exosomen aus Pankreaskarzinom-Zelllinien beeinflussen die relative Expression des tumorassoziierten M2-Markers CCL13 in M2-polarisierten THP1-Zellen	73
Abbildung 23: Exosomen aus Pankreaskarzinom-Zelllinien haben keinen Einfluss auf die relative Expression der M1-Marker in M1-polarisierten THP1-Zellen	75
Abbildung 24: Exosomen aus Pankreaskarzinom-Zelllinien beeinflussen die relative Expression der tumorassoziierten M2-Marker in M2-polarisierten BlaER1-Zellen unterschiedlich.....	77
Abbildung 25: Exosomen aus Pankreaskarzinom-Zelllinien haben keinen Einfluss auf die relative Expression der M1-Marker in M1-polarisierten BlaER1-Zellen	79
Abbildung 26: Testung knock down IGFII mRNA in S2-007-Zellen und die Auswirkung auf die Zellviabilität	82
Abbildung 27: IGFII knock down hat keinen negativen Einfluss auf M2 Makrophagen	84

Abbildung 28: miRNAs werden in S2-007 und M2 THP1-Zellen exprimiert und unter Ko-Kulturbedingungen in Exosomen verpackt	85
---	----

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Laborgeräte	15
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	16
Tabelle 3: Reagenzien und Chemikalien	18
Tabelle 4: Standards	19
Tabelle 5: Primer für die real-time PCR	20
Tabelle 6: Primer für die cDNA-Synthese	20
Tabelle 7: TaqMan Gene Expression Assays und siRNAs	20
Tabelle 8: TaqMan Advanced MicoRNA Assays und miRNA-Inhibitoren	21
Tabelle 9: primäre Antikörper	22
Tabelle 10: sekundäre Antikörper	23
Tabelle 11: Reagenzsysteme und Kits	23
Tabelle 12: Nährmedien und zusätzliche Bestandteile	24
Tabelle 13: Säugerzelllinien	26
Tabelle 14: Puffer und Lösungen	27
Tabelle 15: Computerprogramme	29
Tabelle 16: Mastermix für eine Probe Omniscript	33
Tabelle 17: Geräteeinstellungen für die miRNA-Amplifikationsreaktion	34
Tabelle 18: Maternix für eine Probe SYBR®Green	34
Tabelle 19: Geräteeinstellung für PCR Reaktion SYBR®Green	35
Tabelle 20: Mastermix für eine Probe TaqMan-Sonden	35
Tabelle 21: Geräteeichtellungen für PCR Reaktion TaqMan-Sonden	36
Tabelle 22: Kulturbedingungen von Zellen im 12- und 6-Well Platten	41
Tabelle 23: Puffersysteme für das Lösen von Vesikelpellets je nach angewandter Methode	45
Tabelle 24: Transfektionsschema siRNA IGFII	47
Tabelle 25: Transfektionsschema für miRNA-Inhibitoren	47

Verzeichnis Akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren in Berlin:

Bühl, Büttner, Caligaris, Dubbert, Endesfelder, Endter, Gross, Grounowski, Große-Wiesmann, Grunwald, Götz, Hinderlich, Hungerbüler, Irrgang, Jungblut, Kamp, Kister, Kleffe, Koch, Lübke, Nießen, Popovic, Prowe, Sandow, Schilf, Schlötelburg, Schulze-Tanzil, Schütte, Speer, Williams, Wörner, Vogt

Danksagung

Die vorliegende Doktorarbeit wurde in der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Gastroenterologie durchgeführt. Daher möchte ich mich bei Prof. Dr. Thomas M. Gress dafür bedanken, dass es mir ermöglicht wurde meine Arbeit in seinem Institut anfertigen zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Malte Buchholz für die Bereitstellung des überaus spannenden Themas sowie für seine in jeder Hinsicht umfassende Betreuung, vielfältigen Anregungen und zielführenden Diskussionen während der Promotionsphase und der konstruktiven Kritik bei der Anfertigung der Dissertationsschrift.

Des Weiteren möchte ich mich bei dem kompletten Laborteam für die thematischen Anleitungen, die Bereitschaft mich bei der Labortätigkeit zu unterstützen und das angenehme Arbeitsklima während meiner Doktorarbeit bedanken.

Besonderer Dank gebührt außerdem Alina Hanlon und Veronika Lutz einerseits für das Korrekturlesen meiner Arbeit und andererseits, ebenso wie Bettina Geisel und Prof. Dr. Brigitte Lankat-Buttgereit, für den regen Gedankenaustausch, die Ideen und den Spaß bei der Zusammenarbeit.

Darüber hinaus danke ich meinen Freunden, die mir stets zur Seite standen, mich immer ermutigt haben, trotz manch depressiver Phasen, das Ziel nicht aus den Augen zu verlieren und für die schöne Zeit außerhalb des Labors.

Großer Dank gilt schließlich auch meinen Eltern für die uneingeschränkte Bereitschaft mich zu unterstützen, das Vertrauen und die Möglichkeit meine Ziele zu erreichen.